

EINFLUSS VON LEPIRUDIN AUF DIE TISSUE FACTOR EXPRESSION KULTIVierter HUMANER MONOZYTEN

BIANKA KARLE

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss von Lepirudin auf die Tissue Factor Expression
kultivierter humaner Monozyten**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Bianka Karle

aus Gießen

Gießen 2010

Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Abteilung Kardiologie / Angiologie

Direktor des Zentrums für Kardiologie / Angiologie: Prof. Dr. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. Hans Hölschermann

Gutachter: Prof. Dr. Ritva Tikkanen

Tag der Disputation: 17.05.2011

Inhaltsverzeichnis	Seite
Inhaltsverzeichnis	I - III
Abkürzungsverzeichnis	IV -V
1 Einleitung	1
1.1 Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation	1
1.2 Tissue Factor	6
1.3 Rolle von Monozyten und Tissue Factor in der Pathogenese der Transplantatvaskulopathie	12
1.4 Lepirudin	14
1.5 Einfluss von Lepirudin in der Prävention der Transplantatvaskulopathie	16
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	18
2 Materialien und Methoden	19
2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte (Tabellarische Auflistung)	19
2.2 Zellisolation und Zellkultur	22
2.2.1 Auftrennung von Blutzellen über einen Ficoll-Dichtegradienten	22
2.2.2 Isolierung von Monozyten durch Adhärenzverfahren	24
2.2.3 Vitalität und Reinheit der Zellkulturen	25
2.2.4 Zellkultur	26
2.3 Stimulationsexperimente	26
2.3.1 Stimulation mit bakteriellem Endotoxin	26
2.3.2 Stimulation mit Lepirudin	27
2.3.3 Versuche mit PPACK	27
2.3.4 Kultur- und Stimulationsprotokolle	28
2.4 Messung der prokoagulatorischen Aktivität (PCA)	30
2.5 Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität als TF-Aktivität in Faktor VII defizientem Plasma	31
2.6 Proteinisolierung und quantitative TF-Proteinbestimmung	32
2.6.1 Proteinisolation	32

2.6.2	Quantitative Tissue Factor Proteinbestimmung mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	33
2.7	RNA	35
2.7.1	RNA-Isolierung	35
2.7.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	36
2.7.3	Reverse Transkription	36
2.7.4	Real-time RT-PCR (Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction)	37
2.8	Statistik	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Tissue Factor Induktion durch LPS	43
3.2	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Aktivität von Monozyten	44
3.2.1	TF-Aktivität unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten	44
3.2.2	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Aktivität unstimulierter Monozyten	46
3.2.3	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Aktivität LPS-stimulierter Monozyten	48
3.2.4	Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität als TF-Aktivität in Faktor VII defizientem Plasma	53
3.3	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Proteinexpression von Monozyten	53
3.3.1	TF- Proteinexpression unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten	54
3.3.2	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Proteinexpression unstimulierter Monozyten	55
3.3.3	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Proteinexpression LPS-stimulierter Monozyten	56
3.4	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Gentranskription von Monozyten	59
3.4.1	TF-Gentranskription unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten	59
3.4.2	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Gentranskription unstimulierter Monozyten	60
3.4.3	Einfluss von Lepirudin auf die TF-Gentranskription LPS- stimulierter Monozyten	62
3.5	Beeinflussung der Ergebnisse durch zusätzliche Gabe von PPACK	64
3.6	Reinheit und Vitalität der Zellkulturen	65

4	Diskussion	66
4.1	Diskussion von Tissue Factor und Monozyten in der TVP	66
4.2	Diskussion der Ergebnisse	70
4.3	Wirkmechanismen von Lepirudin	76
4.4	Ausblick	78
5	Publikation	79
6	Zusammenfassung	80
7	Summary	81
8	Literaturverzeichnis	82
9	Abbildungsverzeichnis	95
10	Tabellenverzeichnis	97
	Anhang	98
	Ehrenerklärung	98
	Danksagung	99

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb = Abbildung

AK = Antikörper

aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit

°C = Grad Celcius

cDNA = copy-DNA

C_T-Wert = treshold Cycle-Wert

dNTP's = Desoxyribonucleosidetriphosphate

DSO = Deutsche Stiftung für Organtransplantation

DTT = Dithiotreitol

EDTA = Ethylene diamine tetraacetic acid

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Fa = Firma

F II – XIII = Gerinnungsfaktoren II – XIII

F IIa – XIIIa = aktivierte Gerinnungsfaktoren II – XIII

h = Stunde

HBSS = Hanks-Buffered-Salt-Solution

HIT = Heparin-induzierte Thrombozytopenie

HKG = „Housekeeping Gen“

HTx = Herztransplantation

ISHLT = International Society of Heart and Lung Transplantation

kD = Kilodalton

KHK = Koronare Herzkrankheit

Lepi = Lepirudin

LPS = Lipopolysaccharide

µg = Mikrogramm

ml = Milliliter

mU = Milliunits

min = Minuten

M-SFM = Makrophagen-Serumfreies-Medium

OD = Optische Dichte

oxLDL = oxidized low density lipoprotein

PAR-2 = proteaseaktivierter Rezeptor 2

PBS = Phosphat-Buffered-Saline

PCA = Prokoagulatorische Aktivität

PDGF-BB = platelet derived growth factor-BB

pg = Picogramm

PPACK = D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethylketone

ROS = reactive oxygen spezie

RT-Mix = Reverse-Transkriptase-Mix

TF = Tissue Factor

TMB = Thermo Scientific Pierce

TNF-α = Tumornekrosefaktor α

TLR4 = toll-like receptor 4

TVP = Transplantatvaskulopathie

VEGF = vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation

Im Terminalstadium der Herzinsuffizienz ist die Herztransplantation (HTx) heute ein etabliertes Therapieverfahren (35). Nach dem Register der „International Society of Heart and Lung Transplantation“ (ISHLT) wurden weltweit von 1982 bis 2008 über 80.000 Herztransplantationen durchgeführt (55). Alleine in Deutschland wurden im Jahr 2009 insgesamt 363 Herzen transplantiert. Weitere 773 Patienten sind im selben Jahr neu für eine Herztransplantation gelistet worden (31).

Durch Verbesserungen der immunsuppressiven und antiinfektiösen Therapie konnten in den letzten Jahren die Hauptkomplikationen im ersten Jahr nach Herztransplantation, Rejektion und Infektion (23, 120), deutlich reduziert und damit die Überlebensraten der Patienten verbessert werden. Laut ISHLT beträgt die Ein-Jahresüberlebensrate in erfahrenen Zentren zwischen 90-95%. In den folgenden Jahren nimmt das Überleben der Patienten dann jedoch drastisch ab.

Hierfür wird die sogenannte Transplantatvaskulopathie (TVP) verantwortlich gemacht (35, 50, 110, 120). Sie ist nach dem Register der ISHLT im ersten Jahr nach Herztransplantation bei 8% der Patienten, innerhalb der ersten 5 Jahre bei bereits 32% und nach 8 Jahren bei 43% der Patienten mittels Koronarangiographie nachweisbar (110, 116; Abb. 1). Entsprechend beträgt nach den offiziellen Angaben der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) die Fünf-Jahres-Überlebensrate nach HTx in Deutschland 66%, international 72,2% (30, 31).

Bei der TVP handelt es sich um eine diffus auftretende und häufig rasch fortschreitende Sonderform der koronaren Herzkrankheit (KHK) des transplantierten Herzens (59, 99, 100, 110). Im Unterschied zu den fokalen und exzentrischen Stenosierungen der Koronarsklerose nicht transplantierter Herzen kommt es bei der kardialen Transplantatvaskulopathie typischerweise zu konzentrischen Stenosen über die gesamte Länge der Gefäße. Von der gewöhnlichen Koronarsklerose sind in

der Regel nur die großen epikardialen Gefäße betroffen, während bei der TVP alle kardialen Gefäße Veränderungen aufweisen können.

Das bedeutet, man findet entsprechende diffuse Läsionen sowohl in den epikardialen, myokardialen, kapillären als auch in den venösen Gefäßen des transplantierten Herzens. Die für die gewöhnliche KHK typischen kalzifizierenden Lipidablagerungen findet man bei der TVP nicht. Die Veränderungen der Transplantatvaskulopathie werden demgegenüber typischerweise durch Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in der Intima hervorgerufen (50; Abb. 2). Darüber hinaus werden fast immer entzündliche Reaktionen und eine intakte Elastica interna in den Läsionen der TVP nachgewiesen. Ein Hauptunterschied zur KHK ist jedoch, dass sich die Läsionen der TVP nicht über Jahre oder Jahrzehnte, sondern innerhalb von Wochen bis Monaten entwickeln können (11, 12, 50, 59, 99, 100, 110; Tabelle 1).

Abbildung 1: Angiographischer Befund im Rahmen einer TVP

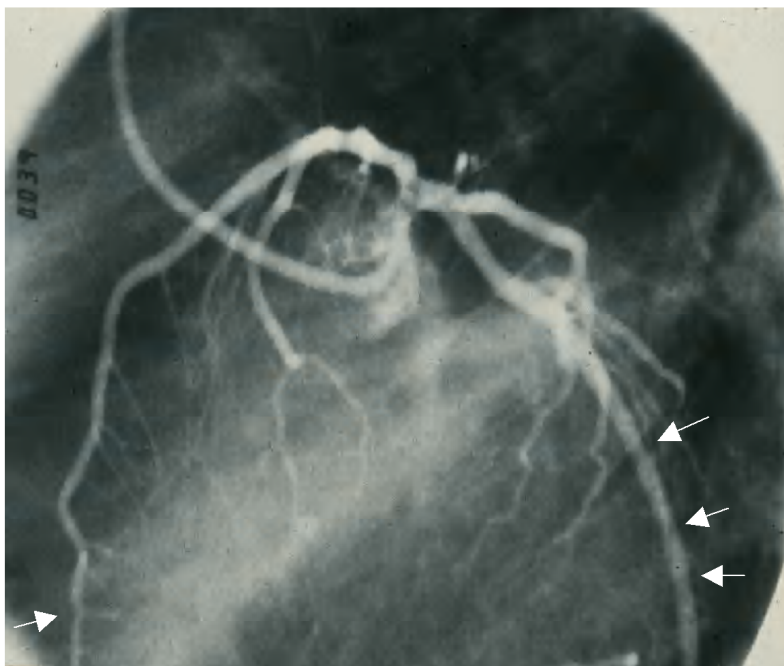


Abb.1: Kontrastmitteldarstellung der Koronararterien unter Durchleuchtung im anterioposterioren Strahlengang im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung. Die Pfeile markieren die diffuse Stenosierung im Verlauf der Koronararterien (Uni Gießen).

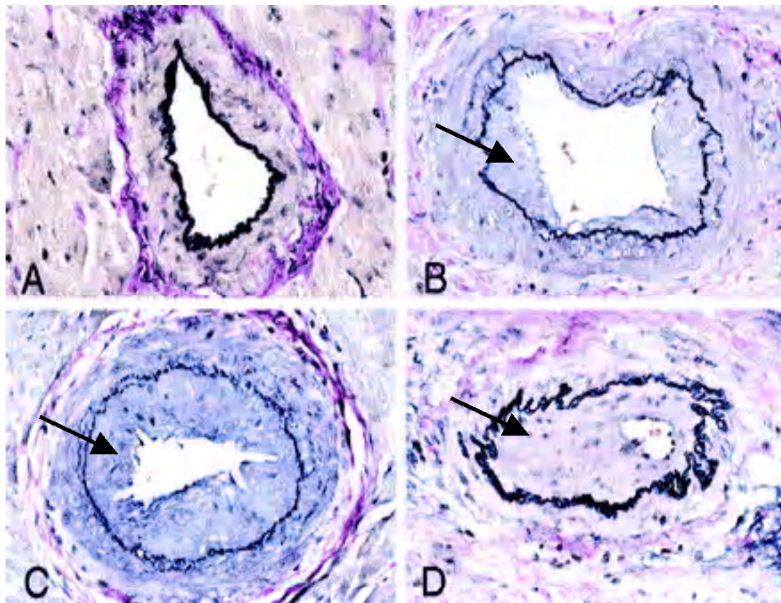
Abbildung 2: Stadien der TVP

Abb.2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines histologischen Koronararterienpräparates mit typischem Befund der verschiedenen histologischen Stadien einer TVP. Zum Normalbefund (A) fällt eine progressive, konzentrische Intimaverdickung auf (B-C, Pfeile), die in einem subtotalen Verschluss des Gefäßlumens mündet (D, Pfeil) (50).

Tabelle 1: Unterschiede Transplantatvaskulopathie und Koronare Herzerkrankung

	Transplantatvaskulopathie	Koronare Herzerkrankung
Beteiligte Gefäße	alle Gefäß-Typen im Transplantat	epikardialen Arterien
Plaque Morphologie	diffus und konzentrisch	fokal und exzentrisch
Inflammation	ja	kaum
Elastica interna	intakt	unterbrochen
Calciumablagerungen	nein	ja

(nach Ramzy 2005, (100))

Ätiologie und Pathogenese der Transplantatvaskulopathie sind trotz intensiver Forschung auf diesem Gebiet nach wie vor unklar. Allgemein geht man heute davon aus, dass das initiale Ereignis bei der TVP auf einer Aktivierung des Gefäßendothels beruht, ausgelöst durch immunologische, inflammatorische, metabolische oder mechanische Faktoren während oder nach der Transplantation (23, 99, 110, 118). Im weiteren Verlauf werden Blutmonozyten rekrutiert, die sich an das aktivierte Gefäßendothel anheften und anschließend in den subendothelialen Raum emigrieren (23, 62, 100). Die typischen Läsionen der TVP entstehen schließlich durch das Einwandern glatter Muskelzellen aus der Media der Gefäße in deren Intima, wo sie proliferieren und zu konzentrischen Verdickungen führen (50, 99, 100, 110).

Die Mechanismen, die der Proliferation der TVP zu Grunde liegen sind unklar, ebenso deren ungewöhnlich rascher Verlauf. Die Gefäßveränderungen der Transplantatvaskulopathie sind stets auf das Spenderorgan begrenzt (120), was die Annahme einer immunologischen Genese der pathologischen Veränderungen unterstützt. Dazu passt auch, dass die Transplantatvaskulopathie nicht nur in den Gefäßen transplanterter Herzen, sondern auch in anderen transplantierten Organen wie Niere, Pankreas und Lunge auftritt (100).

Verschiedene histopathologische Studien konnten interessanter Weise auch zeigen, dass die Adhäsion von Monozyten an das Transplantatendothel von Fibrinablagerungen und der Bildung von Mikrothromben begleitet wird (50, 61). In einer klinischen Studie wurde innerhalb des ersten Monats nach Herztransplantation in 50% aller endomyokardialen Biopsien Fibrin nachgewiesen. Dies korrelierte mit einem deutlich gesteigerten Risiko, im Verlauf eine Transplantatvaskulopathie zu entwickeln (60). Die gleiche Studie konnte in endomyokardialen Biopsien von Spenderherzen vor Transplantation kein Fibrin nachweisen.

Bis heute wird nach spezifischen Ansätzen zur Prävention und Therapie dieser Erkrankung gesucht. Alleine die Vermeidung der klassischen Risikofaktoren der KHK wie die arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Hyperglykämie oder Rauchen genügen nicht, um das Entstehen oder die Progression der TVP aufzuhalten.

Unter der Vielzahl klinischer und tierexperimenteller Studien, die nach einer medikamentösen Therapie suchten, konnte nur für wenige Substanzklassen eine positive Beeinflussung beschrieben werden. HMG-CoA-Reduktasehemmer können die Progression der TVP verlangsamen (52, 100, 118, 122). Mycophenolat Mofetil und Signaltransduktionshemmer wie Everolimus scheinen einen positiven Effekt auf die konzentrischen Intimaverdickungen auszuüben (100, 110). Auch die Vermeidung von CMV-Infektionen mit dem daraus resultierenden endothelialen Schaden soll die Risiken der TVP reduzieren (100, 110, 115).

So lange Ätiologie und Pathogenese der Transplantatvaskulopathie nicht vollständig verstanden wird, bleibt die Behandlung dieser, die Prognose herztransplantierter Patienten bestimmender Erkrankung eine schwierige Aufgabe. Das diffuse Befallmuster der betroffenen Gefäße und deren rasche Progression sind u. a. Gründe dafür, dass die üblichen interventionellen Therapien der KHK nur wenig Erfolg bei der TVP zeigen (110,118).

1.2 Tissue Factor

Tissue Factor ist ein glykosiliertes, 47 kD großes transmembranöses Protein, codiert auf dem ersten Chromosom des menschlichen Genoms (37), das früher auch als Gewebefaktor oder Gewebethromboplastin bezeichnet wurde (16, 17, 88, 103, 109). Aufgrund seiner Tertiärstruktur wird es der Familie der Cytokinrezeptoren zugeordnet (8, 9). Tissue Factor ist ein Polypeptid, das aus 295 Aminosäuren aufgebaut ist. Nach Abspaltung einer Signalsequenz besteht das reife Protein aus 263 Aminosäuren, das in einer extrazellulären Domäne mit 219 Aminosäuren (86; Abb. 3), einer 23 Aminosäuren langen membranösen Domäne, gefolgt von einer kurzen zytoplasmatischen Domäne mit 21 Aminosäuren, organisiert ist (34).

Abbildung 3: Extrazelluläre Domäne von Tissue Factor

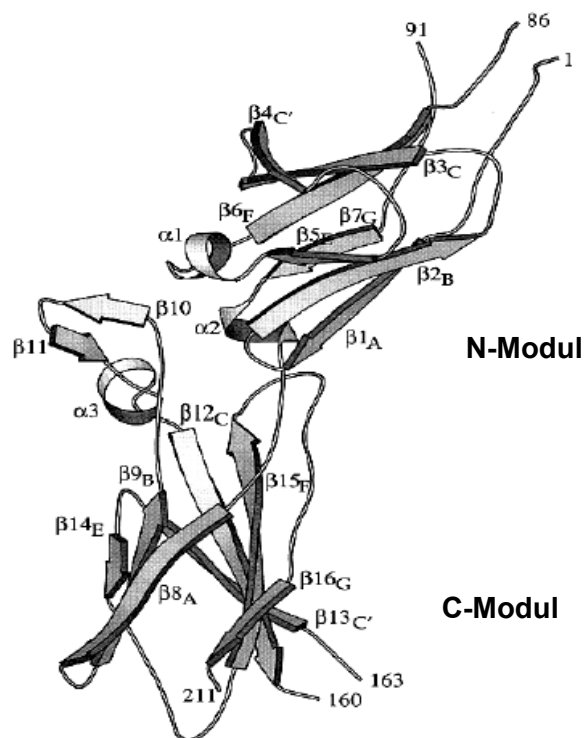


Abb. 3: Die extrazelluläre Domäne von Tissue Factor besteht aus 2 Modulen mit Fibronectin III Struktur. Die 3 α -helikalen Segmente wurden mit $\alpha 1$ -3, die β -Faltblattstrukturen mit $\beta 1_A$ - $\beta 16_G$ bezeichnet. Modul 1 (N-terminales Modul) beinhaltet die Segmente $\alpha 1$ bis $\beta 7_G$, Modul 2 (C-terminales Modul) die Segmente $\beta 8_A$ - $\beta 16_G$. Die Kontaktstellen für F VIIa erstrecken sich vom C-terminalen Modul bis hin zum N-terminalen Modul (86).

Extrazelluläre, transmembranöse und zytoplasmatische Domäne von Tissue Factor erfüllen unterschiedliche Funktionen.

Die extrazelluläre Domäne von Tissue Factor dient als zellulärer Rezeptor und enzymatischer Kofaktor für den Gerinnungsfaktor VII (F VII) (16, 17, 88, 103, 109, 113). Die Verbindung der extrazellulären Domäne von Tissue Factor mit dem im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktor VII ist das primäre physiologische Ereignis, um die Gerinnungskaskade bei Gefäßverletzungen in Gang zu setzen (45, 70, 71, 88).

Nach Verletzung einer Gefäßwand kommt es zunächst zu einem vorläufigen Wundverschluss, indem sich im betroffenen Areal ein wandständiger Plättchenpropf bildet (primäre Hämostase). Eine sichere Abdichtung des verletzten Gefäßes wird dann in einem zweiten Schritt durch Aktivierung der plasmatischen Gerinnung (sekundäre Hämostase) eingeleitet. Dies geschieht durch die intravasale Exposition von TF im betroffenen Areal. Zu den Faktoren, die an der plasmatischen Gerinnung beteiligt sind, zählen neben Enzymen (vor allem Proteinasen) auch Katalysatoren wie z. B. Calcium-Ionen oder Phospholipide sowie verschiedene Regulatorproteine. Die beteiligten Enzyme zirkulieren als inaktive Vorstufen im Blut und werden nach Aktivierung kaskadenartig Enzym um Enzym aktiviert (76, 109; Abb. 4). Am Ende dieser Aktivierungskette entsteht Thrombin, das lösliches Fibrinogen in Fibrin umwandelt und zu einer irreversiblen Thrombozytenaggregation mit Stabilisierung des Plättchenpropfs führt (13).

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade

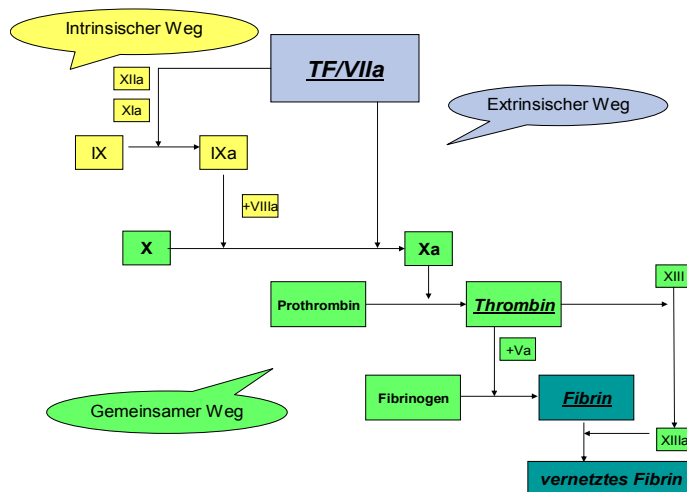


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung der durch Tissue Factor aktivierten extrinsischen und intrinsischen Gerinnungskaskade mit deren gemeinsamer Endstrecke. Pfeile geben die Richtung der katalysierten Reaktionen an. Die Gerinnungsfaktoren XIIa und XIa werden für die Umwandlung von Faktor IX in Faktor IX a benötigt. Gerinnungsfaktor VIIIa wird als Co-Faktor für die Katalyse von Faktor X in Faktor Xa durch den Faktor IXa gebraucht. Ebenso wird Gerinnungsfaktor Va für die Katalyse von Fibrinogen in Fibrin benötigt.

Der enzymatisch aktive TF/VIIa-Komplex kann über die Gerinnungsfaktoren X und IX sowohl den extrinsischen als auch den intrinsischen Gerinnungsweg aktivieren (70, 88). Beide Wege haben eine gemeinsame Endstrecke, die über Thrombin-Bildung zur Fibrin-Generation und Thrombozytenaktivierung führt (13, 33, 74). Der ebenfalls über Thrombin in Faktor XIIIa umgewandelte Gerinnungsfaktor XIII führt zur Verknüpfung der Fibrinpolymere und deren Ablagerung (26).

Die durch den TF/VIIa-Komplex ausgelöste Aktivierung der Gerinnungskaskade führt aber nicht nur zur Fibrin-Bildung, sondern über die Thrombin-Generation auch zum sogenannten vaskulären Remodeling (102), das durch die Abgabe von Wachstumsfaktoren aus aktivierten Thrombozyten ausgelöst wird. Thrombin und FXa

können darüber hinaus noch die Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen induzieren (43, 72) sowie Endothelzellen modifizieren (25).

Durch die Verankerung des TF/FVIIa-Komplexes in negativ geladenen Phospholipidmembranen wird dessen katalytische Aktivität deutlich (ca. 1000fach) gesteigert (7).

Verschiedene Studien weisen außerdem darauf hin, dass Tissue Factor noch weitere Funktionen außerhalb des Hämostasesystems einnimmt (102). Man geht heute davon aus, dass die zytoplasmatische Domäne von Tissue Factor, ausgelöst durch intrazelluläre Phosphorylierungsprozesse (28), eine Rolle bei Zellmigration, Tumormetastasierung und Signaltransduktion spielt.

Die Interaktion der phosphorylierten zytoplasmatischen Domäne von TF mit dem aktinbindenden Protein 280, das Zellmigration und Zellausbreitung beeinflusst, wird für prometastatische Eigenschaften von Tissue Factor verantwortlich gemacht (94, 95, 96). Eine Beteiligung der intrazellulären Domäne von Tissue Factor an verschiedenen Signaltransduktionsprozessen, vermittelt durch den proteaseaktivierten Rezeptor 2 (PAR-2), ist mittlerweile ebenfalls gut dokumentiert (75, 102). Die PAR-2-vermittelte Signaltransduktion soll unter anderem eine entscheidende Rolle an der durch den TF/FVIIa-Komplex ausgelösten TF-Endozytose und dem Transport von intrazellulär gespeichertem TF auf die Zelloberfläche spielen (74, 75).

Darüber hinaus stimuliert der TF/FVIIa-Komplex in menschlichen Fibroblasten und Endothelzellen die Sekretion von „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) (92). Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass die zytoplasmatische Domäne von TF die VEGF-Sekretion und Angiogenese beeinflussen kann (2, 10).

Unter physiologischen Bedingungen wird Tissue Factor konstitutiv von verschiedenen Zelltypen exprimiert. Dazu gehören unter anderem Fibroblasten und Perizyten der Tunica adventitia unserer Blutgefäße oder Fibroblasten der Organkapseln. Aber auch auf den epithelialen Oberflächen der Schleimhäute, in der

Epidermis und in stark durchbluteten Geweben wie beispielsweise in den Nierenglomeruli, im Gehirn, im Herzmuskel, auf Alveolarmakrophagen und Stromazellen des Endometriums wird Tissue Factor konstitutiv exprimiert (38, 40). Tissue Factor fungiert hier als „hämostatische extravaskuläre Hülle“ (29) zum Schutz unserer Gefäße und Organe vor Blutungen. Unter physiologischen Bedingungen exprimieren Zellen im zirkulierenden Blut sowie Endothelzellen der Gefäße keinen Tissue Factor (29, 97), da dies sofort zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade führen würde. Aber auch intravasale Zellen wie Monozyten und Endothelzellen können nach entsprechender Stimulation zur Synthese und Expression von Tissue Factor auf ihrer Zelloberfläche angeregt werden (16, 17, 24, 97). Auslöser hierfür können inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Interferon, Endotoxine, Virusinfektionen, Thrombin, Immunkomplexe, Phorbol ester und die Bindung an Zelladhäsionsmoleküle sein (67, 68, 85, 112, 125).

Die Expression von Tissue Factor auf vaskulären Zellen kann zu einer unkontrollierten Gerinnungsaktivierung innerhalb des Gefäßsystems führen und zu einem wesentlichen pathogenetischen Faktor für verschiedene Krankheitsbilder werden. Gut dokumentiert ist seine pathogenetische Rolle im Rahmen der disseminierten intravasalen Gerinnung. Hierbei kommt es, ausgelöst durch die äußere Membran gramnegativer Bakterien, zur exzessiven Expression von Tissue Factor auf Monozyten, Endothelzellen und Epithelzellen und durch die damit hervorgerufene überschießende intravasale Gerinnung zum Verbrauch sämtlicher Gerinnungsfaktoren (22, 64). Die Thromboseneigung von Tumorpacienten ist vermutlich ebenfalls Folge einer pathologischen intravasalen TF-Expression. Tumorgewebe, Tumorendothelzellen und Blutmonozyten von Pacienten mit malignen Erkrankungen weisen eine erhöhte Expression von Tissue Factor auf (32, 39, 69, 101, 111). Durch seine prokoagulatorische Aktivität soll Tissue Factor außerdem die Verbindung von Tumorzellen mit der Gefäßwand ermöglichen und damit an der Metastasierung von Tumoren beteiligt sein (69, 105, 107). Eine pathologische intravaskuläre TF-Expression findet man auch im Rahmen der rheumatoiden Arthritis, einer Erkrankung mit sowohl immunologischen als auch inflammatorischen Komponenten (14). Auch in der Genese arterieller Thrombosen, die in der Regel auf

dem Boden arteriosklerotischer Plaques entstehen (41, 113), spielt Tissue Factor eine Rolle. Besonders in instabilen Plaques, die zur Ruptur neigen, lassen sich hohe Konzentrationen von Tissue Factor nachweisen (6, 80).

Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Tissue Factor im Blut nicht nur auf Monozyten, sondern auch im Plasma in sehr geringer Konzentration gefunden wird (4, 44). Zirkulierender Tissue Factor befindet sich auf Mikropartikeln, die von aktivierten oder apoptotischen Monozyten, Thrombozyten, Endothelzellen oder glatten Muskelzellen stammen (57, 63, 113). Dieser sogenannte „blood born“-Tissue Factor (44) kann in intravasal entstehenden Thromben akkumulieren (44).

Tissue Factor ist einerseits für unsere Hämostase ein essentieller Faktor. Eine Tatsache die dadurch bestätigt wird, dass bisher kein angeborener Mangel an Tissue Factor beschrieben wurde, der mit dem Leben vereinbar ist (18). Andererseits ist er aber auch an multiplen immunologischen und inflammatorischen Prozessen beteiligt. Quellen einer pathologischen intravasalen TF-Expression sind dabei intravasale Monozyten, vaskuläre Endothelzellen und in geringen Mengen auch zirkulierende Mikropartikel.

1.3 Rolle von Monozyten und Tissue Factor in der Pathogenese der Transplantatvaskulopathie

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass es in der Primärphase der Transplantatvaskulopathie zur Adhäsion von Monozyten an die Gefäßintima des transplantierten Organs kommt (3, 23, 62, 100), gefolgt von Fibrinablagerungen entlang der Gefäßwände (50, 60, 61, 123). In einer Studie konnte bereits innerhalb des ersten Monats nach Herztransplantation in 50% aller endomyokardialen Biopsien Fibrin nachgewiesen werden. Dies korrelierte mit einem deutlich gesteigerten Risiko, im weiteren Verlauf eine Transplantatvaskulopathie zu entwickeln (60). Hierbei handelt es sich um Beobachtungen, die für eine pathologische Gerinnungsaktivierung in den Gefäßen transplanterter Organe sprechen.

Monozyten interagieren mit unserem Gerinnungssystem über verschiedene Mechanismen.

Aktivierte Monozyten können durch die Expression von Tissue Factor unsere plasmatische Gerinnung aktivieren, die über die Thrombinbildung zur Fibrinogenation führt (16, 97). Sie können durch eine Vielzahl von Stimuli zur TF-Expression angeregt werden. C-reaktives Protein, CD40-Ligand, „platelet derived growth factor-BB“ (PDGF-BB), Angiotensin II, „oxidized low density lipoprotein“ (oxLDL) und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) können die TF-Expression sowohl in zirkulierenden Monozyten als auch in Makrophagen induzieren (67, 68, 69, 113). Einen weiteren Stimulus für Makrophagen stellen proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ dar (113).

Man geht heute davon aus, dass die daraus resultierende Fibrinbildung dazu beiträgt, Entzündungsprozesse zu begrenzen und die Ausbreitung von Bakterien und anderen Krankheitserregern zu verhindern.

Darüber hinaus können zirkulierende Monozyten durch Zytokine und Chemokine, die von verletztem Gewebe freigesetzt werden, zum Ort des Gewebeschadens gelockt werden (1, 19) und dann über eine Vielzahl von Integrinen und Adhäsionsmolekülen

eine feste Bindung mit dem betroffenen Endothel eingehen (89).

Die am Endothel gebundenen Monozyten sind in der Lage Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und „reactive oxygen spezies“ (ROS) zu sezernieren und darüber eine TF-Expression der Endothelzellen zu induzieren (87, 113). Das bedeutet, dass Monozyten durch direkten zellulären Kontakt mit Endothelzellen diese aktivieren und eine prokoagulatorische Antwort hervorrufen können. Dieser Vorgang wird durch die Sezernierung von Zytokinen und proinflammatorischen Mediatoren verstärkt (87).

Weiterhin sind Monozyten eine Hauptquelle für die Bildung von Tissue Factor-reichen Mikropartikeln, denen heute eine wichtige Rolle in der Regulation von Endotheldysfunktion und Hämostase zugeschrieben wird. Zum Beispiel kann Endothel durch diese Mikropartikel aktiviert werden oder kann leukozytäre Antigene passiv aufnehmen, wodurch wiederum Veränderungen von zellulären oder membrangebundenen Adhäsionsmolekülen induziert werden (54, 83).

Die Tissue Factor Expression von Monozyten stellt somit ein Bindeglied zwischen Inflammation und Gerinnungskaskade dar. Sowohl Inflammation als auch pathologische Gerinnungsaktivierung sind Mechanismen, die in der Pathogenese der TVP eine Rolle zu spielen scheinen (50, 51, 52, 53).

Ausgehend hiervon, könnte eine gezielte Beeinflussung der TF-Expression (21) eine Strategie in Therapie und Prävention der Transplantatvaskulopathie darstellen.

1.4 Lepirudin

Lepirudin ist ein rekombinant hergestelltes Hirudin. Nativ gewonnenes Hirudin ist ein einkettiges Polypeptid bestehend aus 65 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 6,95 kD, das sich aus den Speicheldrüsen des medizinischen Blutegels „*Hirudo medicinalis*“ extrahieren lässt (78). Hirudin ist ein spezifischer Inhibitor der Proteinase Thrombin, die eine zentrale Stellung in der durch Tissue Factor induzierten plasmatischen Gerinnung einnimmt. Seine Wirkung entfaltet Hirudin dabei direkt, indem es einen hochaffinen stöchiometrischen Komplex mit Thrombin eingeht, wodurch dessen aktives Zentrum blockiert wird (79, 90; Abb. 5). Thrombin verliert dadurch sowohl seine katalytische Aktivität gegenüber Fibrinogen und anderen Gerinnungsfaktoren (u.a. FXIII) als auch seine Fähigkeit, an Zellrezeptoren zu binden (90, 121).

Abbildung 5: Angriffspunkt von Hirudin in der Gerinnungskaskade

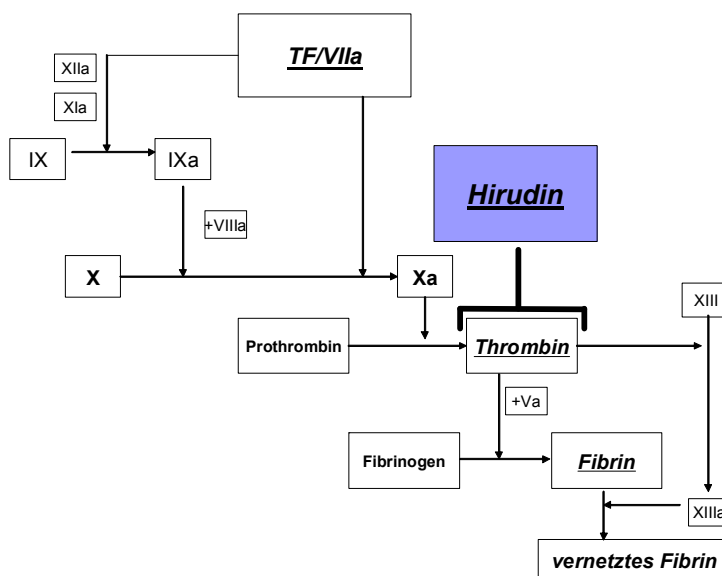


Abb. 5: Angriffspunkt des direkten Thrombin-Inhibitors Hirudin in der durch Tissue Factor aktivierten Gerinnungskaskade.

Hirudin kann mittlerweile synthetisch hergestellt werden (73, 90) und steht als rekombinantes Hirudin für den klinischen Gebrauch zur Verfügung. Da rekombinanten Hirudinen eine Sulfatgruppe an der Aminosäure Tyrosin an Position 63 fehlt, werden sie auch als Desulfatohirudine oder Desirudine bezeichnet.

Lepirudin ist solch ein rekombinantes Hirudin, das aus Hefezellen gewonnen wird und ebenfalls aus 65 Aminosäuren (Molekulargewicht: 6979,5 Dalton) aufgebaut ist. Im Unterschied zu nativem Hirudin hat es eine 10 x niedrigere Affinität zu Thrombin, bleibt aber ein potenter Inhibitor desselben (121).

Seine Aktivität wird in einem chromogenen Test ermittelt. Eine Antithrombin-Einheit (ATE) entspricht der Menge Hirudin, die eine Einheit der *WHO-Zubereitung 89/588* von Thrombin neutralisiert. Die spezifische Aktivität von Lepirudin beträgt ca. 16.000 ATE/mg. Die Halbwertszeiten von Desirudinen betragen 1-3 Stunden (104).

Als Hauptindikation für Hirudine ist die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) Typ II anzusehen. In Deutschland wurde Lepirudin (Refludan®) als erste Substanz dieser Gruppe für die Indikation HIT Typ II und parenterale Antikoagulation zugelassen (Datum der Zulassung: 13.03.1997, Datum der letzten Verlängerung der Zulassung: 05.03.2007) (104, 119).

1.5 Einfluss von Lepirudin in der Prävention der Transplantatvaskulopathie

Die Expression von Tissue Factor durch vaskuläre Zellen wie Monozyten und konsekutive intravasale Ablagerungen von Fibrin sind zentrale Ereignisse in der Initialphase der Transplantatvaskulopathie (50, 58, 61, 60, 81, 123).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten in klinischen Studien zeigen, dass sowohl nach Herztransplantation (60, 81, 123) als auch nach Nierentransplantation (93) Fibrinablagerungen entlang der Gefäßwände des transplantierten Organs gefunden werden. Dies sind Befunde, die in verschiedenen Tiermodellen bestätigt werden konnten (50, 61).

Ausgehend von der Annahme, dass es in transplantierten Organen zu einer gesteigerten Gerinnungsaktivierung kommt, untersuchten verschiedene Arbeitsgruppen transplantierte Organe auf die Expression von Tissue Factor, dem Initiator der plasmatischen Gerinnung.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang in heterotop transplantierten Rattenherzen eine signifikant gesteigerte Tissue Factor Expression entlang der Endothelzellen und auf interstitiellen Monozyten nachweisen, die so in nativen, nicht transplantierten Herzen nicht gefunden wurde (51). Diese Beobachtung konnte von einer amerikanischen Arbeitsgruppe 2002 anhand von Rechtsherzbiopsien herztransplantierter Patienten bestätigt werden. Dieser Gruppe gelang es auch eine Korrelation zwischen TF-Expression und der Wahrscheinlichkeit, eine Transplantatvaskulopathie zu entwickeln, herzustellen (123). Eine schwedische Arbeit aus dem Jahr 2005 konnte in den Biopsien nierentransplanterter Patienten kongruente Befunde, mit erhöhter intravaskulärer TF-Expression und dem Risiko eine chronische Nierentransplantatvaskulopathie zu entwickeln, nachweisen (93).

In unserer Arbeitsgruppe führte der Nachweis der pathologischen de-novo-Expression von Tissue Factor auf Monozyten und Endothelzellen in den

transplantierten Rattenherzen zu der Frage, ob durch eine Modulation dieser intravasalen Gerinnungsaktivierung die TVP mit ihrer progredienten Intimaproliferation nach Herztransplantation beeinflusst werden kann. Hierfür wurden die transplantierten Tiere mit rekombinantem Hirudin (Lepirudin) behandelt. Für rekombinante Hirudine konnte zu diesem Zeitpunkt bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Gefäßmodellen eine Verringerung von Gefäßwandproliferationen nachgewiesen werden (98, 108). In den von unserer Arbeitsgruppe transplantierten Rattenherzen reduzierte eine lang andauernde Behandlung mit Lepirudin (über 120 Tage) sowohl Ausmaß als auch Inzidenz der Transplantatvaskulopathie. Die Hirudin-induzierte Hemmung der Intimaproliferation in den Gefäßen der transplantierten Herzen war kongruent mit einer Hemmung der de-novo-Expression von Tissue Factor in den transplantierten Gefäßen sowie einer verminderten Tissue Factor Gentranskription (50).

Dieser Effekt von Lepirudin könnte entweder auf einer direkten Hemmung der Tissue Factor Gentranskription oder aber indirekt auf einer Inaktivierung von Thrombin beruhen, da Thrombin die Expression von Tissue Factor in vaskulären Endothelzellen induzieren (98, 113) und zur Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (43, 72) führen kann.

Ein direkter Einfluss von Lepirudin oder Hirudinen im Allgemeinen auf die Tissue Factor Expression von Monozyten unter Ausschluss von Interaktionen mit Thrombin ist bisher noch nicht beschrieben worden.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Lepirudin auf die Tissue Factor Expression humaner Monozyten in einem Zellkulturmodell untersucht.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welchen Einfluss hat Lepirudin auf die Tissue Factor Aktivität unstimulierter und mit LPS zur Tissue Factor Expression stimulierter humaner Monozyten?
2. Beeinflusst Lepirudin die Tissue Factor Proteinexpression humaner Monozyten vor und nach LPS-Stimulation?
3. Nimmt Lepirudin Einfluss auf die Tissue Factor Gentranskription in humanen Monozyten?
4. Können indirekte Thrombin-Effekte von Lepirudin im Zellkulturmodell ausgeschlossen werden?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien, Chemikalien und Geräte

(Tabellarische Auflistung)

Plastik- und Verbrauchsmaterialien

Röhrchen, 50 ml, steril (Polyethylen)	Fa. Greiner, Frickenhausen
Röhrchen, 15 ml, steril (Polyethylen)	Fa. Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen, 250 ml, steril	Fa. Greiner, Frickenhausen
6-Wellplatten (Ø 35 mm/ Well), steril	Fa. Greiner, Frickenhausen
24-Wellplatten (Ø 15 mm/ Well), steril	Fa. Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, versch. Größen	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipetten, versch. Größen	Fa. Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen, versch. Größen	Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Zellschaber, steril	Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Materialien, Lösungen und Geräte für Zellisolation und Zellkultur

Makrophagen-Serumfreies-Medium (M-SFM)	Fa. Gibco, Eggenstein
Hanks-Buffered-Salt-Solution (HBSS)	Fa. Gibco, Eggenstein
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	Fa. Gibco, Eggenstein
Penicillin/ Streptomycin Solution	Fa. Gibco, Eggenstein
Humanes Citratplasma	Fa. Boehringer, Ingelheim
Aqua dest. Iniectionabilia	Fa. Braun, Melsungen
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9%)	Fa. Braun, Melsungen
Gelantin (300 Bloom)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Lipopolysaccharide (E. coli 0112:B4)	Fa. Sigma, Deisenhofen
Ficoll-Plaque Research Grade	Fa. Pharmacia, Upsalla, Schweden
EDTA (Versen) 1%	Fa. Biochrom KG, Berlin
Refludan®	Fa. Hoechst Marion Roussel, Frankfurt a. M.
PPACK	Fa. BIOMOL GmbH, Hamburg

Millex-GS sterile Filter (Ø 0,22 µm)	Fa. Milipore, Eschborn
Brutschrank Vacutherm	Fa. Heraeus, Hanau
Megafuge 1.0	Fa. Heraeus, Hanau
Sterilbank	Fa. Heraeus, Hanau
Mikroskop Leica-DMIL	Fa. Leica Mikrosystems, Wetzlar
Wärmeschrank	Fa. Memmert, Schwabach
FACScan Beckon Dickinson BD	Fa. Biosciences, Heidelberg

Zytologische Färbung

Trypanblau 0,4%	Fa. Sigma, Deisenhofen
-----------------	------------------------

Materialien, Lösungen und Geräte für die Messung der prokoagulatorischen Aktivität

Standard Humanplasma	Fa. Behring, Marburg
Faktor VII defizientes Plasma	Fa. Behring, Marburg
Calciumchlorid-Lösung (0,025 mol/l)	Fa. Behring, Marburg
Wasserbad	Fa. Köttermann, Uetze-Hänigsen

Materialien, Lösungen und Geräte für die quantitative TF-Proteinbestimmung

Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	Fa. Gibco, Eggenstein
Aqua dest. iniectionabilia	Fa. Braun, Melsungen

<u>IMUBIND® Tissue Factor ELISA Kit:</u>	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA
16-Well Mikrotteststrips (beschichtet mit Capture-Antikörper gegen humanen TF)	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA
TF-Standards (0-1000 pg/ml)	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA
Detection-Antikörper gegen humanen TF	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA
Streptavidin-horseradisch Peroxidase	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA
Substrat, TMB	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA
25% Triton X-100	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA

1 Packet PBS Pulver, pH 7,4	Fa. American Diagnostica inc., Greenwich, USA
H ₂ SO ₄ 0,5 M	Fa. Sigma, Deisenhofen
96-Well Mikrotiterplatte	Fa. Falcon Becton Dickinson Labware, Heidelberg
Titramax 100 Rüttler	Fa. Heidolph, Schwabach
Eppendorf Zentrifuge 5417 R	Fa. Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer, Spectra SLT	Fa. Gemini BV, Apeldoorn, Niederlande

Materialien, Lösungen und Geräte für die RNA-Isolation und Real-time-RT-PCR

Tris-HCl	Fa. Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂	Fa. Sigma, Deisendorf
KCl	Fa. Sigma, Deisendorf
NaCl	Fa. Sigma, Deisendorf
Dithiotreitol (DTT)	Fa. Sigma, Deisendorf
Roti-Quick-Kit zur RNA-Isolierung	Fa. Roth, Karlsruhe
Randomisierte Hexanucleotide	Fa. Boehringer, Karlsruhe
RNAsin	Fa. Promega, Madison, USA
Reverse Transkriptase, M-MLV	Fa. Gibco, Eggenstein
Puffer, 5-fach konzentriert	Fa. Gibco, Eggenstein
dNTP's	Fa. Perkin Elmer, Norwalk, USA
Ethanol 96%	Fa. Aldrich Laborchem., Seelze
Megafuge 1.0	Fa. Heraeus, Hanau
GenAmp PCR System 2400	Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
Eppendorf BioPhotometer	Fa. Eppendorf AG, Hamburg
CFX96 TM Real-Time PCR mit Detection System + Software	Fa. BIO-RAD, München

<u>EvaGreen® Supermix:</u>	Fa. BIO-RAD, München
EvaGreen® PCR-Reaktionspuffer	Fa. BIO-RAD, München
12,5 mM MgCl ₂ (= 2,5 mM in 1x Lösung)	Fa. BIO-RAD, München
dATP, dGTP, dCTP und dTTP	Fa. BIO-RAD, München
EvaGreen®-Farbstoff	Fa. BIO-RAD, München
ROX-Farbstoff (interner Referenzfarbstoff)	Fa. BIO-RAD, München
Aqua dest. iniectionabilia	Fa. Braun, Melsungen
β-Actin-Primer 3'	Fa. Metabion GmbH, Martinsried
β-Actin-Primer 5'	Fa. Metabion GmbH, Martinsried
Tissue Factor-Primer 3'	Fa. Metabion GmbH, Martinsried
Tissue Factor-Primer 5'	Fa. Metabion GmbH, Martinsried

2.2 Zellisolation und Zellkultur

2.2.1 Auftrennung von Blutzellen über einen Ficoll-Dichtegradienten

Humane periphere Blutmonozyten wurden nach der Methode von Bøyum (15) durch Dichtegradientenzentrifugation über einem Ficoll-Gradienten gewonnen. Mit Hilfe dieser Methode kann man aus Vollblut oder „Buffy Coats“ periphere mononukleäre Zellen durch Ausnutzung der unterschiedlichen Dichte der einzelnen zellulären Blutbestandteile gewinnen. Nach Zentrifugation setzen sich Erythrozyten und Granulozyten in der unteren Phase ab und mononukleäre Zellen und Thrombozyten reichern sich in der Interphase ringförmig an (Abbildung 6).

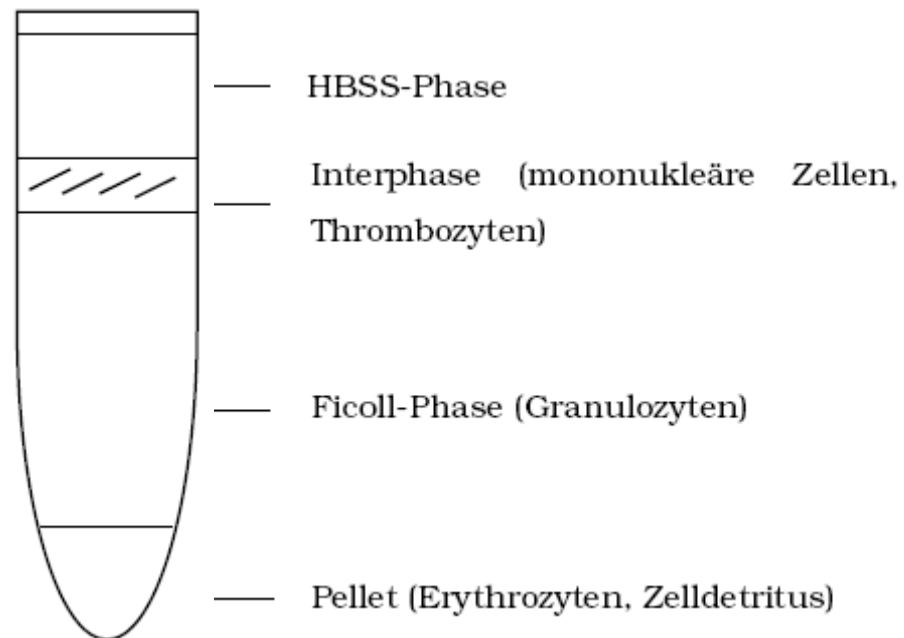
Abbildung 6: Dichtegradientenzentrifugation

Abb. 6: Ausbildung der verschiedenen Phasen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Die mononukleären Zellen reichern sich in der Interphase an.

Zur Isolierung humaner peripherer Monozyten wurden „Buffy Coats“ gesunder Blutspender der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen verwendet. „Buffy Coats“ fallen bei der Verarbeitung von Frischblutspenden an und bilden nach Zentrifugation des Spenderblutes die Interphase zwischen Plasmaüberstand und Erythrozytenkonzentrat. „Buffy Coats“ enthalten überwiegend den leukozytären Anteil der Blutspende. Für die Zellisolation wurde jeweils ein Pool aus zehn „Buffy Coats“ verwendet. Die gepoolten „Buffy Coats“ wurden im Verhältnis 1:1 mit „Hanks balanced salt solution“ (HBSS) verdünnt. 25 ml dieser Zellsuspension wurden über 20 ml Ficoll-Plaque in sterilen, verschließbaren 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und bei 600x g ohne Bremse für 30 Minuten bei 18 °C zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurden die Interphasen zwischen Ficoll-Plaque und Serum/HBSS-Phase vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen. Zur weiteren Reinigung der mononukleären Zellen von Ficoll-Plaque-Resten und Thrombozyten, die sich ebenfalls in diesem Bereich ansammeln, wurden die Interphasen in 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen und auf 50 ml mit HBSS aufgefüllt. Anschließend

wurden die Röhrchen erneut, diesmal bei 200x g für zehn Minuten und 18 °C, zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellpellets in HBSS resuspendingiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellpellets in „Makrophagen- Serumfreien Medium“ (M-SFM) resuspendingiert.

Das zur Isolation und Zellkultur verwendete serumfreie Medium wurde zur Vermeidung von bakteriellen Infektionen mit 100 IE Penicillin/ml und 100 IE Streptomycin/ml versetzt.

2.2.2 Isolierung von Monozyten durch Adhärenzverfahren

Bei dieser Methode wird die starke Adhärenz von Monozyten an Fibronectin genutzt. Durch das Adhärenzverfahren wird eine Trennung von monozytären und nicht monozytären Zellen (Thrombozyten, Granulozyten, Erythrozyten) durch Fibronectinbindung der monozytären Zellen an einer entsprechend präparierten Oberfläche erreicht.

Hierfür wurden speziell beschichtete Kulturflaschen hergestellt. Je 10 ml einer steril filtrierten 1%igen Gelantinlösung wurden in Gewebekulturflaschen (250 ml) pipettiert und für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die überstehende Gelantinlösung verworfen und die Kulturflaschen in einem Wärmeschrank getrocknet. 30 Minuten vor Aufnahme der mononukleären Zellen wurden die Kulturflaschen mit humanem, Fibronectin enthaltenden Citratplasma inkubiert und anschließend drei mal gründlich mit HBSS abgespült. Je 10 ml Zellsuspension wurden in eine Kulturflasche gegeben. Nach Inkubation der Zellen für 60 Minuten bei 37 °C in feuchtigkeitsgesättigter, 5% CO₂ enthaltender Atmosphäre wurden die nicht adhärenen Zellen durch mehrmaliges „waschen“, sprich durch sorgfältiges ausspülen der Kulturflaschen mit HBSS, entfernt. Zum Lösen der adhärenen Monozyten wurden die Flaschen mit einer Lösung aus steriler „Phosphat-Buffered-Saline“-Lösung und EDTA (10 mmol) zehn Minuten lang inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden danach in der EDTA/PBS-Lösung aus den Zellkulturflaschen aufgenommen und mit 200x g für 10 Minuten bei 18 °C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Zellen in vorgewärmten M-SFM resuspendingiert.

2.2.3 Vitalität und Reinheit der Zellkulturen

Von den frisch isolierten Monozyten wurden Proben zur Zellzählung, Vitalitätsprüfung und Prüfung des Reinheitsgrades entnommen. Zur Zellzählung und Zellvitalitätsprüfung wurden nach der Isolation 50 µl Zellsuspension mit 50 µl 0,4%iger Trypanblaulösung in eine Mikrotiterplatte pipettiert und mit einer Pipettenspitze gründlich durchmischt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend in eine Langendorffzählkammer pipettiert. Bei einer 40-fachen Vergrößerung wurden die Zellen in dem in 16 Einzelfeldern unterteilten Zählfeld ausgezählt. In jedem Einzelfeld wurden auch die Zellen auf der linken und oberen Begrenzungslinie ausgezählt. Insgesamt wurden jeweils vier Zählfelder ausgezählt und die durchschnittliche Zellzahl pro Zählfeld bestimmt. Zur Berechnung der Zellzahl pro ml wurde die durchschnittliche Zellzahl pro Zählfeld mit dem Faktor 10000 multipliziert und das Ergebnis mit dem Faktor 2 multipliziert, um die Verdünnung mit der Trypanblaulösung zu berücksichtigen (Formel 1). Zellen mit defekten Plasmamembranen, deren Zytoplasma sich nach Trypanblaufärbung mit dem Farbstoff anfärbte, wurden als nicht vital gewertet (Formel 2). Der durchschnittliche Anteil von vitalen Zellen lag über 90%.

Formel 1:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zellzahl im Zählfeld} \times 10000 \text{ (Zählkammer)} \times 2 \text{ (Verdünnung)}$$

Formel 2:

$$\text{Prozentualer Anteil der lebendigen Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{(\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen})} \times 100$$

Darüber hinaus erfolgte die Überprüfung von Reinheit und Vitalität der Zellkulturansätze mittels durchflusszytometrischer Analyse in einem FACS-Gerät (fluorescence-activated cell sorter). Mit der Durchflusszytometrie lassen sich anhand charakteristischer Partikelgröße und Eigenfluoreszenz verschiedene Zellpopulationen innerhalb einer Zellsuspension identifizieren und quantifizieren. Hierzu erfolgt die Markierung der Zellen mit einem Primärantikörper und einem

fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Der Fluoreszenzantikörper wird dann im Durchflusszytometer durch Laserlicht angeregt und Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, das bestimmten Zelltypen zugeordnet werden kann.

2.2.4 Zellkultur

Als Inkubationsmedium diente stets M-SFM, supplementiert mit Penicillin und Streptomycin (je 100 IE/ml). Für die Zellkultur wurden die Zellen in M-SFM auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen bei 37 °C, einer CO₂-Sättigung von 5% und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Den Zellkulturexperimenten ging stets eine Ruhephase von 20 Stunden und zum Ende der Ruhephase eine Mediumwechsel zur Entfernung apoptotischen Materials voraus.

Für die verschiedenen Untersuchungsmethoden erfolgte die Kultivierung der Monozyten in den folgenden Zellkultursystemen:

- | | |
|-------------------------|---|
| a) TF-Aktivität | 6-Wellplatten (Ø 35 mm/ Well),

1x 10 ⁶ Monozyten/ Well |
| b) TF-Proteinexpression | 24-Wellplatten (Ø 15 mm/ Well),

3x 10 ⁵ Monozyten/ Well |
| c) TF-mRNA-Expression | 6-Wellplatten (Ø 35 mm/ Well),

3x10 ⁶ Monozyten/ Well |

2.3 Stimulationsexperimente

2.3.1 Stimulation mit bakteriellem Endotoxin

Als bakterielles Endotoxin wurde Lipopolysaccharid (LPS) von E. coli- Bakterien (Serotyp: O11:B4) verwendet. Für die Induktion der TF-Aktivität und TF-

Proteinexpression wurden humane Monozyten jeweils sechs Stunden mit LPS (10 µg/ml Medium) stimuliert. Zur Induktion von TF-mRNA wurden die Zellproben vier Stunden mit LPS (10 µg/ml Medium) stimuliert. Bei allen Versuchen wurden unstimulierte Zellproben mitgeführt. In Abbildung 7 und Abbildung 8 werden die Stimulationsprotokolle graphisch dargestellt.

Am Ende aller Experimente erfolgte ein 2-5maliger Waschvorgang der Proben mit PBS. Die Experimente wurden schließlich mit dem Einfrieren der Kulturen bei -80 °C zur späteren Messung beendet.

2.3.2 Stimulation mit Lepirudin

In isotoner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) gelöstes Lepirudin (Refludan®) wurde in verschiedenen Untersuchungsansätzen und mit unterschiedlichen Konzentrationen (100, 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 µg/ml Medium) LPS-stimulierten und unstimulierten Monozyten zugesetzt. Der Zeitpunkt der Zugabe von Lepirudin wurde in Bezug auf die LPS-Stimulation unterschiedlich gewählt. In ausgewählten Ansätzen wurden die Zellen zwei Stunden mit Lepirudin vorstimuliert. In anderen Versuchen wurde Lepirudin und LPS gleichzeitig zu den Monozyten pipettiert. Für weitere ausgewählte Experimente wurde Lepirudin erst zwei Stunden nach Stimulation mit LPS zugesetzt. Kontrollen in Abwesenheit von Lepirudin durch Zugabe des Lösungsmittels NaCl 0,9% wurden durchgeführt. In Abbildung 9 und Abbildung 10 werden die Stimulationsprotokolle graphisch dargestellt.

Am Ende aller Experimente erfolgte ein 2-5maliger Waschvorgang der Proben mit PBS. Die Experimente wurden schließlich mit dem Einfrieren der Kulturen bei -80 °C zur späteren Messung beendet.

2.3.3 Versuche mit PPACK

In ausgewählten Versuchsansätzen wurde zu Beginn der Stimulationsexperimente den Proben der potente, irreversible Thrombin-Inhibitor PPACK, gelöst in Aqua dest. Iniectionabilia, hinzugefügt (3 U/ml entsprechen $3 \text{ U}/10^6$ Zellen). Bei PPACK (D-Phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethylketone) handelt es sich um ein

Chloromethylketon ($C_{21}H_{31}N_6O_3$), das vorhandenes Thrombin binden und dadurch inaktivieren kann (124). Indirekte Thrombin-Effekte auf die folgenden Stimulationsexperimente sollten so ausgeschlossen werden.

2.3.4 Kultur- und Stimulationsprotokolle

Abbildung 7: Unstimulierte TF-Expression

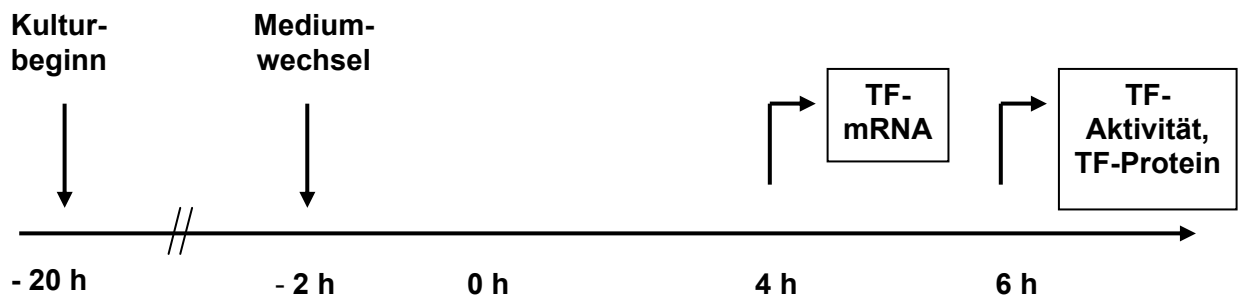


Abbildung 8: LPS-stimulierte TF-Expression

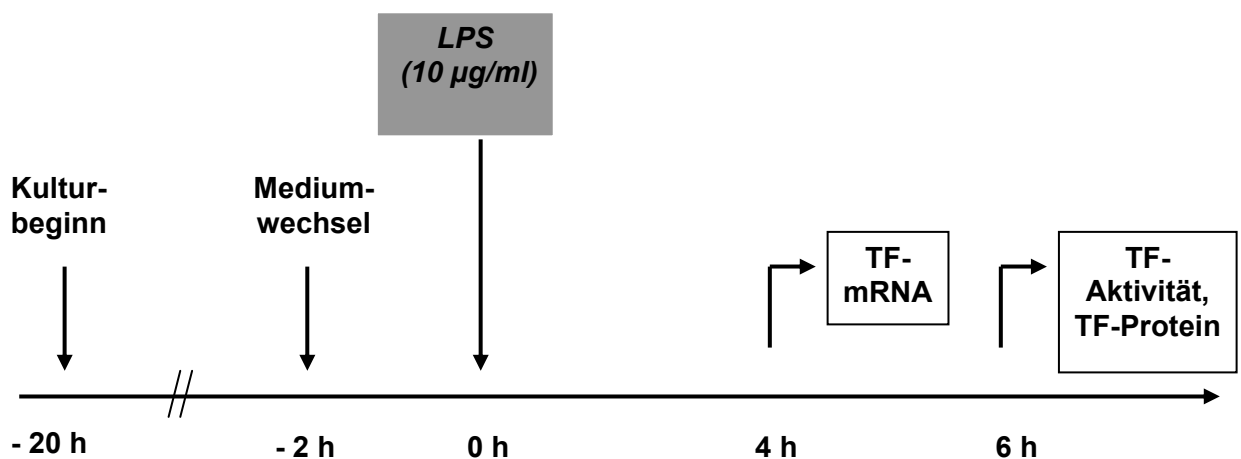
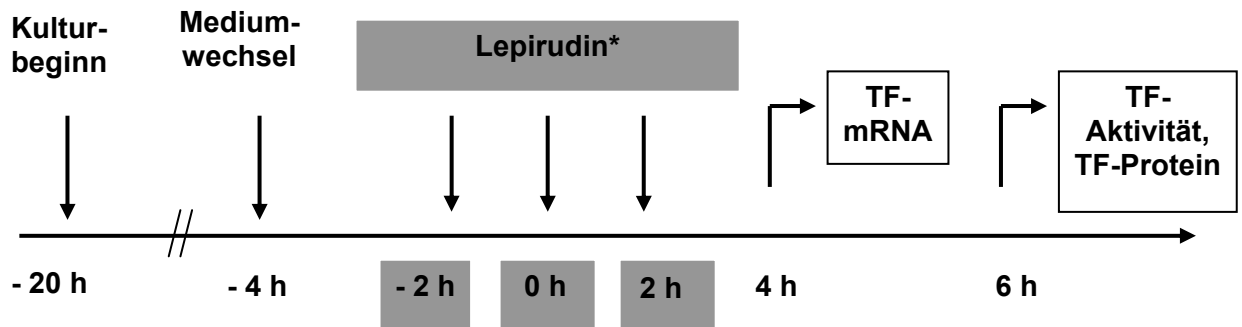
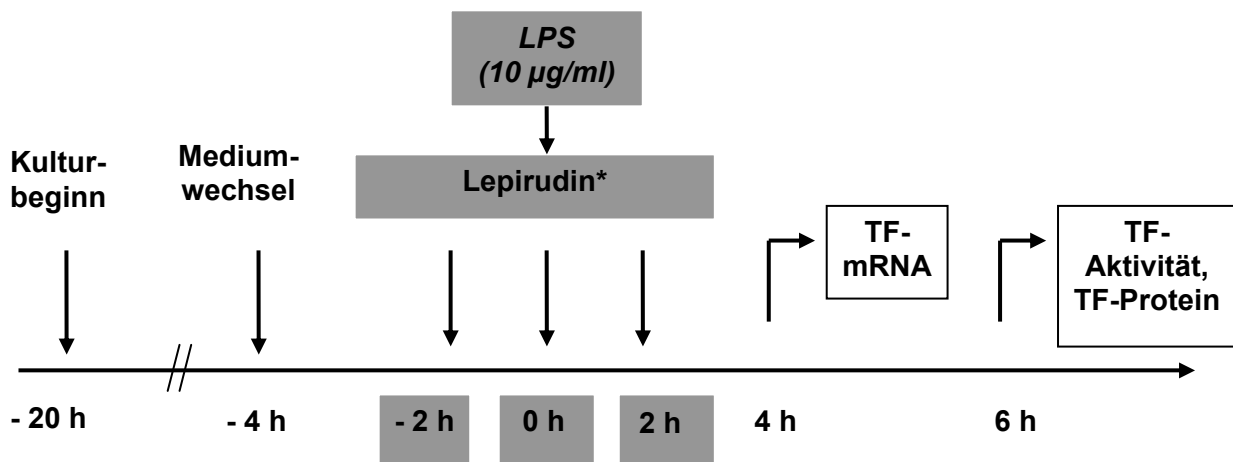


Abbildung 9: Lepirudin, unstimulierte TF-Expression

* Die Inkubation mit Lepirudin erfolgte in verschiedenen Untersuchungsansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen (100, 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 $\mu\text{g/ml}$ Medium) und zu verschiedenen Zeitpunkten.

Abbildung 10: Lepirudin + stimulierte TF-Expression

* Die Inkubation mit Lepirudin erfolgte in verschiedenen Untersuchungsansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen (100, 10, 1, 0,1, 0,01 und 0,001 $\mu\text{g/ml}$ Medium) und zu verschiedenen Zeiten (120 Minuten vor LPS-Stimulation, gleichzeitig mit LPS bzw. in ausgesuchten Experimenten 120 Minuten nach LPS-Zugabe).

2.4 Messung der prokoagulatorischen Aktivität (PCA)

Die prokoagulatorische Aktivität der Monozyten wurde mit Hilfe eines Gerinnungstestes („*clotting assay*“) bestimmt (49), durch den indirekt die Tissue Factor Aktivität auf Zelloberflächen gemessen werden kann.

Am Ende aller PCA-Experimente erfolgte ein gründlicher 5maliger Waschvorgang der Proben mit PBS. Mit dem Einfrieren der Kulturen bei -80 °C wurden die Experimente zur späteren Messung beendet.

Für die Messung wurden die Zellen frühestens nach 72 Stunden wieder aufgetaut, vom Boden der Wells abgeschabt, das Zelllysate in ein Reaktionsgefäß überführt und erneut bei -80 °C schockgefroren. Um vollständig homogene Zelllysate zu erhalten, wurden noch drei weitere Auftau- und Einfrierschritte durchgeführt. Für die Messung wurden 50 µl Zelllysate und 50 µl Standard Humanplasma für drei Minuten in einem 12 x 75 mm Plastikröhrchen in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Gerinnung durch Zugabe von 50 µl Calciumchlorid-Lösung (0,025 mmol) gestartet sowie für jede Probe die Zeit von der Zugabe der Calciumchlorid-Lösung bis zur Bildung eines Fibringerinnsels bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die gemessenen Gerinnungszeiten wurden dann mit Hilfe einer mitgeführten Standardreaktionskurve in Milliunits (mU) Thromboplastinaktivität (= prokoagulatorische Aktivität) umgerechnet (Abb.11). Die Standardkurve wurde durch Mehrfach-Bestimmungen der Gerinnungszeit von Thromboplastinstandard, gewonnen aus Hirngewebe von Kaninchen, in einer definierten Verdünnungsreihe erstellt. Diese verlief nach doppeltlogarithmischer Auftragung in den Bereichen zwischen 1 mU (310 sec.) und 10.000 mU (20 sec.) linear. Alle Werte wurden in mU/ml bzw. 10^6 Zellen angegeben.

Als Negativkontrollen dienten Kulturmedium (PCA<1 mU), PBS (PCA<1 mU), Aqua bidest. (PCA<1 mU) und NaCl 0,9% (PCA< 1 mU).

**Abbildung 11: Standardverdünnungskurve eines „rabbit brain“
Thromboplastinstandards**

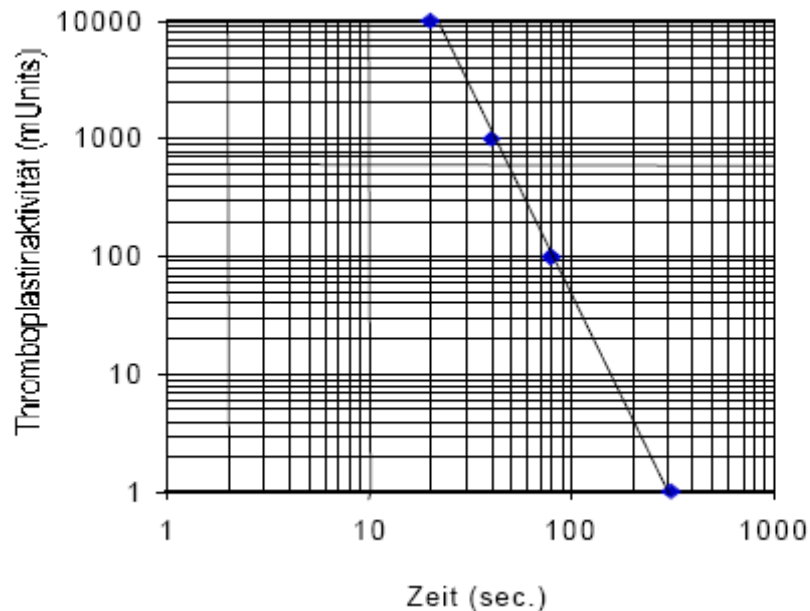


Abb. 11: Thromboplastinstandardkurve verschiedener Verdünnungen eines Hasenhirn-Thromboplastinstandards in Barbitursäurepuffer. Nach doppelt-logarithmischer Auftragung verläuft die Kurve linear zwischen 1 mU (310 sec) und 10.000 mU (20 sec.). Die Gerinnungszeiten von Proben wurden durch Vergleich mit dem Standard in mU Thromboplastinaktivität umgerechnet.

2.5 Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität als TF-Aktivität in Faktor VII defizientem Plasma

Zur funktionellen Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität als TF-Aktivität wurde die PCA LPS-stimulierter Monozyten in Faktor VII defizientem Plasma bestimmt und mit den Gerinnungszeiten in Normalplasma verglichen. Die Bestimmung der PCA erfolgte nach der unter Kapitel 2.4 beschriebenen Methodik.

2.6 Proteinisolierung und quantitative TF-Proteinbestimmung

2.6.1 Proteinisolation

Für die Proteinisolation zur Bestimmung des Tissue Factor-Antigens auf Monozyten wurden Reagenzien, die im IMUBIND® Tissue Factor ELISA Kit der Firma *american diagnostica inc.* enthalten waren, verwendet.

Am Ende der Stimulations-Experimente wurden die Überstände der Proben verworfen und die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen und trocken bei -80 °C eingefroren. Zur Bearbeitung der Proben wurden die Zellkulturplatten aus dem Gefrierschrank entnommen, jeder Probenansatz mit 400 µl Zelllyse-Puffer (1%iges Triton X + TBS) pro 1×10^5 Zellen aufgefüllt und bei Raumtemperatur aufgetaut.

Zelllyse-Puffer:

500 µl 10%Triton X-100 in 50 ml TBS lösen, pH 8,5, entspricht 1%igem Triton X Zelllyse-Puffer.

100 µl dieses Puffers werden für die Lyse von 25.000 Zellen benötigt.

TBS-Puffer:

NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Tris-HCL 3 g

in 800ml H₂O lösen, pH 8,5.

Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig von jeder einzelnen Well gelöst, die entstandene Zellsuspension in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und sofort auf Eis gestellt. Nach mehrmaligem Vortexen der einzelnen Reaktionsgefäße waren die Proben zur weiteren Analyse bereit.

2.6.2 Quantitative Tissue Factor Proteinbestimmung mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Für die quantitative Bestimmung von humanem Tissue Factor wurde der IMUBIND® Tissue Factor ELISA Kit der Firma *american diagnostica inc.* verwendet. Es handelte sich dabei um ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basierte. Bei diesem ELISA Kit wurden zwei Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das nachzuweisende Antigen TF binden konnten („*double-antibody-sandwich*“-ELISA). Als spezifische Antikörper wurden gegen humanen Tissue Factor gerichtete murine monoklonale Antikörper (AK) verwendet.

Der erste spezifische TF-Antikörper („*capture*“-AK) war fest in den Wells von Mikroteststrips gebunden. Am ersten Tag wurden je 100 µl von TF-Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration und je 100 µl Zelllysate (entsprach 25.000 Zellen/Well) der einzelnen Proben in die AK-beschichteten Wells pipettiert. Es folgte die Inkubation der Proben in einer feuchten Kammer über Nacht (mindestens drei Stunden) bei 6 °C. Anschließend erfolgte ein viermaliger gründlicher Waschvorgang der Proben und Standardlösungen mit einem speziellen im ELISA Kit enthaltenen Waschpuffer. Die ungebundenen Bestandteile der Proben sollten durch den Waschvorgang entfernt werden, so dass nur am Antikörper gebundener Tissue Factor zurück blieb.

Wasch-Puffer:

PBS-Pulver, pH 7,4 (im ELISA Kit enthalten)

Aqua dest. 900 ml

Detergent (Triton X-100) 4 ml

ad 1000 ml Aqua dest.

Je Ansatz wurden dann 100 µl eines zweiten TF-spezifischen Antikörpers („*detection*“-Antikörper) hinzugefügt, gefolgt von einer Inkubationszeit der abgedeckten Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneuter viermaliger

gründlicher Waschung mit dem Waschpuffer zur Entfernung von überschüssigen Antikörpern wurden je 100 µl Enzymkonjugat zu den einzelnen Ansätzen hinzugegeben. Eine weitere Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit anschließendem viermaligem Waschen folgte. Im nächsten Schritt wurden 100 µl Substratlösung in jede Well gegeben, die Mikrotiterplatte abgedeckt und eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei Raumtemperatur abgewartet. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0,5 M H_2SO_4 pro Well gestoppt. Das Substrat wurde vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch einen Farbumschlag (verschiedene Blauschattierungen) erfolgte (Abbildung 12). Alle Messungen der einzelnen Proben wurden in Triplikaten durchgeführt.

Abbildung 12: Schematisches Prinzip des „double-antibody-sandwich“- ELISA

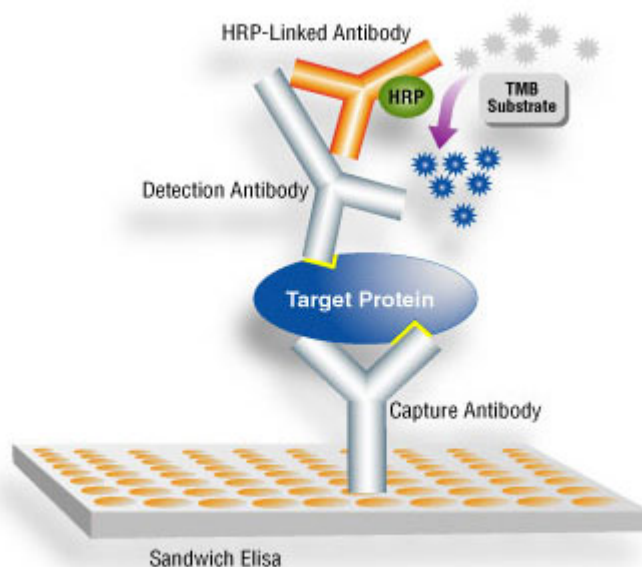


Abb. 12: Schematischer Aufbau eines Sandwich-ELISA: An den auf einer Mikrotiterplatte gebundenen ersten Antikörper (Capture-Antibody) bindet das Zielprotein (Target Protein), an das wiederum ein zweiter Antikörper (Detection-Antibody) andocken kann. Durch Zugabe eines Enzyms (hier: HRP = Streptavidin-horseradish peroxidase bzw. HRP-Linked Antibody), das an den zweiten Antikörper andockt, kann ein spezifisches Substrat (hier: TMB) umgesetzt werden (*Cell Signaling Technology® Homepage*).

Für den quantitativen Nachweis wurde eine Serie mit bekannten TF-Konzentrationen mitgeführt. Durch Messungen der optischen Extinktion der einzelnen Proben in einem Plattenphotometer (Spectra SLT) bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb von 30 Minuten wurden die TF-Konzentrationen bestimmt. Das Plattenphotometer ermittelte aus den mitgeführten Standardlösungen eine Kalibrierungskurve (Standardkurve) und gab nach Vergleich mit dieser die Konzentration der einzelnen Proben in pg/ml an.

2.7 RNA

2.7.1 RNA-Isolierung

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurde die Guanidinium-Thiozyanat-Phenol-Chloroform-Methode verwendet (20, Roti-Quick-Kit, Fa. Roth).

Am Ende der Stimulationsexperimente wurden die Zellen nach Entfernung des Mediumüberstandes zweimalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 1000 µl Guanidiniumthiozyanat pro ml Medium (Lösung 1, Roti-Quick-Kit) lysiert. Die Extraktion der RNA erfolgte durch Zugabe eines 1:24 Phenol-Chloroform-Gemisches (1000 µl/ml Medium, 4 °C; Lösung 2, Roti-Quick-Kit) zu den einzelnen Zelllysaten. Die einzelnen Ansätze wurden hierfür für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.600x g für 15 Minuten und 4 °C, gefolgt von einer erneuten Inkubation für fünf Minuten auf Eis, um die entstehenden Phasen besser sichtbar zu machen. Die obere Phase der einzelnen Ansätze wurde anschließend entnommen, je 1000 µl Isopropanol pro ml Medium (Lösung 3, Roti-Quick-Kit) hinzugegeben und für zwei Stunden bei -80 °C gelagert. Dadurch wurde die vollständige Ausfällung der RNA erreicht. Eine weitere Aufreinigung der RNA erfolgte durch Zentrifugation (10.600x g, 4 °C, 15 Minuten) und Resuspension des entstandenen Pellets in Guanidiniumthiozyanat und Isopropanol (je 300 µl). In einem weiteren Zentrifugationsschritt (20.800x g, 4 °C, 15 Minuten) wurde die RNA sedimentiert. Das dabei entstehende Pellet der einzelnen Proben wurde in zwei weiteren Zentrifugationsschritten (je 20.800x g, 4 °C, 10 Minuten) mit 96%igem Ethanol

gewaschen und anschließend in RNase-freiem Aqua bidest. rückgelöst. Die Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

2.7.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Messung der Gesamt-RNA-Konzentration erfolgte spektralphotometrisch durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm. Der OD-Wert bei $\lambda = 260$ nm entspricht dem Extinktionsmaximum der enthaltenen Nukleinsäuren und damit der RNA-Konzentration in $\mu\text{l/ml}$. Durch Bestimmung der OD bei $\lambda = 280$ nm kann die Konzentration von Proteinen, die die Probe verunreinigen, ermittelt werden. Der Quotient aus beiden optischen Dichten (OD 260/ OD 280) ist somit ein Maß für die Reinheit der RNA-Proben. Der Referenzbereich liegt zwischen 1,6 und 1,8. Niedrige Quotienten weisen auf starke Verunreinigungen der Proben hin. Für reine RNA-Präparate würde der Quotient 1,8 betragen.

2.7.3 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in eine so genannte copy-DNA (cDNA) umgeschrieben.

Dies erfolgte mittels Random-Priming-Technik unter Zugabe einer Hexanukleotid-Mischung. 1 μg der hergestellten RNA wurde hierfür mit Aqua dest. auf ein Volumen von 25 μl ergänzt und bei 65 °C für 10 Minuten vorinkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 25 μl eines Reverse-Transkriptase-Mixes (RT-Mix) mit anschließender Inkubation der einzelnen Ansätze bei 37 °C für 60 Minuten.

RT-Mix:

Random-Primer (2,2 mU)	1,5 µl
dNTP's (je 10 mU)	je 1 µl
RNAsin (40 U)	0,5 µl
Reverse Transkriptase (200 U)	1 µl
5-fach konzentrierter Puffer	5 µl
DTT (100 mU)	2 µl

ad 25 µl RNase-freies Aqua.

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz im Anschluss für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die cDNA wurde in dem GenAmp PCR System 2400 standardisiert synthetisiert.

2.7.4 Real-time-RT-PCR**(Real-time reverse transcriptase polymerase chain-reaction)**

Der Nachweis von Tissue Factor Genexpression wurde quantitativ mittels Echtzeit-RT-PCR (Real-time RT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde ein TacMan-PCR Gerät der Firma BIO-RAD, das CFX96 Real-time-System inklusive Software verwendet. Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts sind dabei simultan in einem Reaktionsgefäß durch die Detektion eines Fluoreszenzsignals in Echtzeit („Real-time“) möglich (84,106). Als „Housekeeping Gen“ (HKG) wurde β -Actin verwendet, das ubiquitär und homogen exprimiert wird. Negativkontrollen wurden bei allen PCR-Experimenten mitgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer für Tissue Factor und β -Actin sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Primer

Gene	Primer	Sequenz
TF	Forward	5'-TTT GGA GTG GGA ACC CAA ACC CGT CA-3'
TF	Reverse	5'-ACC CGT GCC AAG TAC GTC TGC TTC ACA T-3'
β -Actin	Forward	5'-AAA GAC CTG TAC GCC AAC ACA GTG CTG TCT-3'
β -Actin	Reverse	5'- CGT CAT ACT CCT GCT TGC TTG GCT GAT CCA CAT CTG-3'

Jede einzelne Probe wurde in einem eigenen PCR-Reaktionsgefäß auf das Ziel-Gen Tissue Factor und auf das HKG β -Actin untersucht.

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der synthetisierten cDNA wurden je 1,2 μ l cDNA der einzelnen Proben mit einer PCR-Stammlösung und Aqua dest. auf 20 μ l aufgefüllt. Die Stammlösung enthielt je 3 μ l spezifische 5' und 3' Primer (Forward und Reverse Primer) sowie 10 μ l EvaGreen®. EvaGreen® enthielt alle notwendigen Komponenten für eine quantitative Echtzeit-PCR-Analyse (Taq-DNA-Polymerase, PCR-Reaktionspuffer, 12,5 mM MgCl₂, die vier Nucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP sowie den EvaGreen®-Farbstoff). Bei dem EvaGreen®-Farbstoff handelte es sich um einen sogenannten interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich während Primeranlagerung und -elongation in die entstehende doppelsträngige DNA einlagerte („*interkalierte*“), wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs anstieg und gemessen werden konnte. Nach Einsetzen der Proben in das CFX96 Real-time-System wurde es zunächst auf 50 °C für 2 Minuten vorgewärmt. Anschließend wurde die Temperatur zur Aktivierung der Taq-Polymerase und Denaturierung der DNA für 10 Minuten auf 95 °C erhöht. Es folgten 40 Zyklen bestehend aus jeweils 15 Sekunden bei 95 °C zur Denaturierung der DNA und 30 Sekunden

bei 60 °C für die Primeranlagerung und -elongation.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde wie bereits erwähnt der interkalierende Farbstoff EvaGreen® verwendet. Interkalierende Farbstoffe fluoreszieren nur dann, wenn sie im Doppelstrang eingelagert sind (Abbildung 13). Die Zunahme der Fluoreszenz korrelierte dabei mit der Zunahme des PCR-Produktes von Zyklus zu Zyklus. Messungen fanden jeweils am Ende der Elongation eines Zyklus statt.

Abbildung 13: Prinzip interkalierender Farbstoffe

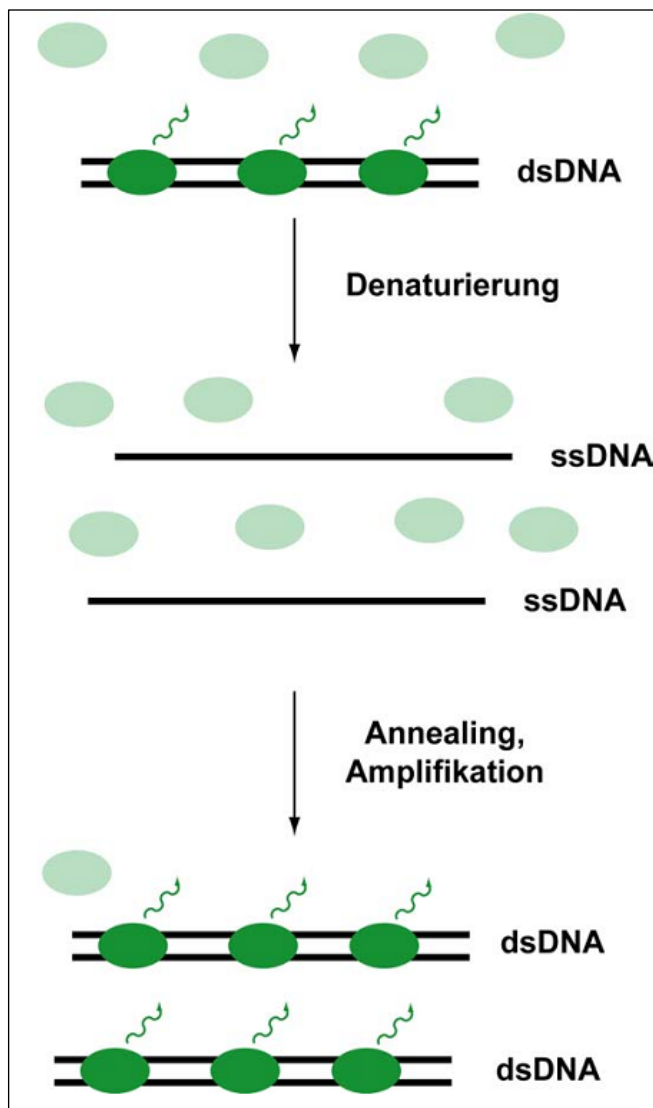


Abb.13: Der interkalierende Farbstoff lagert sich während Primeranlagerung und -elongation in die doppelsträngige DNA (dsDNA) ein und beginnt dadurch zu fluoreszieren. Aufgrund der Temperaturerhöhung am Beginn des nächsten Zyklus *denaturiert* die dsDNA wieder in einzelsträngige DNA (ssDNA), wodurch der interkalierende Farbstoff wieder seine Fluoreszenz verliert. Im Rahmen des nächsten *Annealing* und *Amplifikations-* Schritts interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff erneut in die entstehende dsDNA. Die Zunahme der Fluoreszenz korreliert dabei mit der Zunahme des PCR-Produktes von Zyklus zu Zyklus (*Biometra homepage*).

Um die Spezifität dieses Verfahrens zu erhöhen, wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Die entstandene doppelsträngige DNA musste hierfür aufgeschmolzen werden, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wurde (50 °C → 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturierte der Doppelstrang zu zwei Einzelsträngen. Der interkalierte Fluoreszenzfarbstoff EvaGreen® wurde dadurch freigesetzt und die resultierende Fluoreszenzabnahme registriert. Da doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, war eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gab Auskunft über die Menge der gebildeten Ziel-DNA (77).

Mit Hilfe der Computersoftware wurde das Fluoreszenzsignal jeder einzelnen Probe in Echtzeit bestimmt. Der dabei ermittelte C_T -Wert (threshold Cycle) korrelierte mit der Höhe vorhandener Ziel-DNA (Tissue Factor, β -Actin). Proben mit quantitativ größeren Mengen Ziel-DNA hatten niedrigere C_T -Werte, weil weniger PCR-Zyklen benötigt wurden, bis die Intensität der Fluoreszenz des interkalierten Farbstoffs der Hintergrund-Fluoreszenz entsprach. Der C_T -Wert wurde unter Berücksichtigung eines internen Referenzwertes für die Quantifizierung der Ziel-DNA verwendet.

Bei der hier angewandten relativen Quantifizierung wurde die Expression des Zielgens (Tissue Factor) mit der des HKGs (β -Actin) „normalisiert“. Das bedeutet, es wurden nicht die absoluten Konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des Zielgens wurde auf die Expression des HKGs bezogen. Vorteile der „Normalisierung“ liegen in der Reduzierung der Varianz von Expressionsergebnissen, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionskoeffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer Probe Zielgen und HKG gleichermaßen betreffen und sich dadurch in den angewandten Berechnungen aufheben.

Für die Berechnung der relativen Expression von Tissue Factor mRNA, normalisiert durch unser HKG β -Actin, wurde die sogenannte $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet (65). Zunächst wurde dabei im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des HKGs vom C_T -Wert des Zielgens subtrahiert (Formel 3).

Formel 3:

$$\Delta C_T = C_T\text{-Zielgen} - C_T\text{-HKG}$$

Nach diesem Schritt wurde vom ΔC_T -Wert der experimentellen Probe der ΔC_T -Wert einer Kontrolle abgezogen. Als Kontrolle kann eine Probe der Versuchsreihe herangezogen werden (z. B. die nur mit LPS stimulierte Probe). Man erhält hierdurch den sogenannten $\Delta\Delta C_T$ -Wert (Formel 4).

Formel 4:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T\text{-Probe} - \Delta C_T\text{-Kontrolle}$$

Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), „normalisiert“ zum HKG und bezogen auf eine Standardprobe ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Formel 5).

Formel 5:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung von mindestens vier unabhängigen Versuchsreihen ($n = 4$) angegeben. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Eine Normalverteilung der Daten lag vor.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels Student-t-Test zum Vergleich von zwei Gruppen. Für die statistische Auswertung wurde das Programm *StatsDirect Statistical Software (Version 2.0.0)* verwendet. Die Datenerfassung und Grafikerstellung erfolgte mit Excel, Microsoft.

Das Kriterium für die Beibehaltung bzw. Ablehnung der jeweils getesteten Hypothese war die Irrtumswahrscheinlichkeit „p“, die im Ergebnisteil angegeben wird. Statistische Signifikanz lag vor, wenn der p-Wert kleiner 0,05 war.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte in einem Zellkulturmodell der Effekt von Lepirudin (Refludan®) auf die Tissue Factor Expression humaner Monozyten unter standardisierten Bedingungen untersucht werden. Die Effekte von Lepirudin auf die im serumfreien Medium kultivierten Monozyten wurden sowohl an unstimulierten als auch an mit LPS (*E. coli* O111:B4) stimulierten Monozyten untersucht.

3.1 Tissue Factor Induktion durch LPS

Die Inkubation der Monozyten mit LPS (*E. coli* O111:B4) im serumfreien Kulturmedium führte zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Induktion der TF-Aktivität im Gerinnungstest (Abb. 14a und 14b).

Abbildung 14a und 14b: LPS-induzierte TF-Aktivität in humanen Monozyten

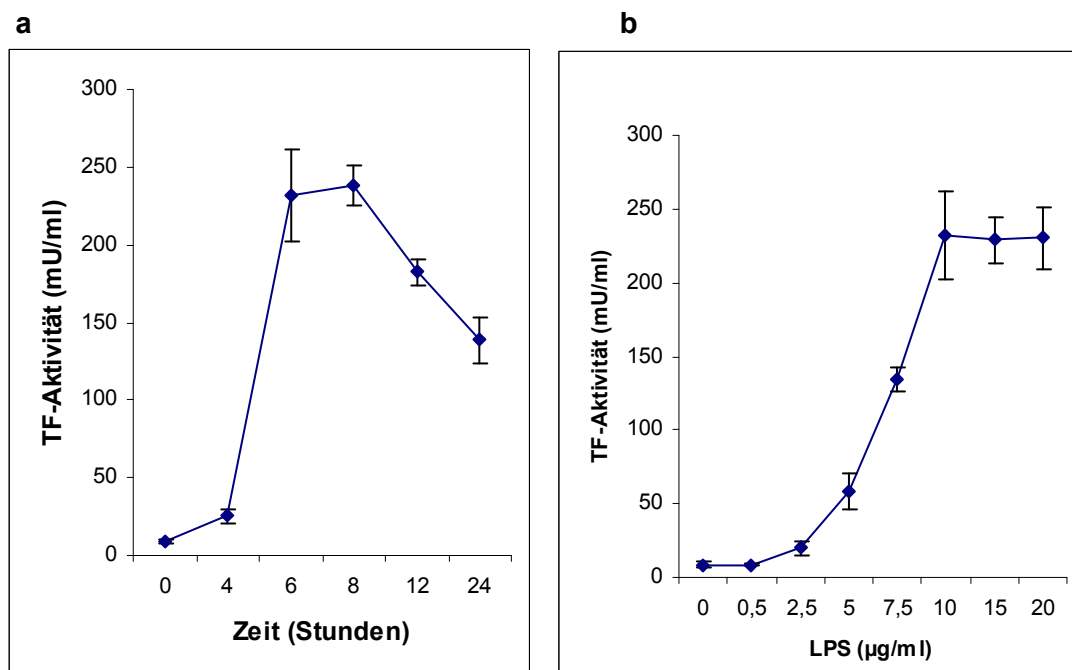


Abb. 14a und 14b: Abbildung 14a zeigt die TF-Aktivität humaner Monozyten nach Inkubation mit LPS (10 µg/ml) in den angegebenen Zeiten (0-24 Stunden). In Abbildung 14b wird die TF-Aktivität humaner Monozyten nach sechs Stunden Stimulation mit LPS in den angegebenen Konzentrationen (0-20 µg/ml) dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchsreihen ($n = 4$) angegeben. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt.

Nach sechs bis acht Stunden Stimulation mit 10 µg/ml LPS konnte eine maximale Induktion der TF-Aktivität erreicht werden. Analog zu diesem LPS-Effekt auf die TF-Aktivität ließ sich die TF-Proteinexpression zeit- und konzentrationsabhängig induzieren. Der maximale Effekt konnte nach sechs Stunden Inkubation mit 10 µg/ml LPS erzielt werden. Für die TF-mRNA Induktion ergab sich bei einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml nach vier Stunden ein maximaler Effekt.

Die Inkubation der Zellen mit LPS in den angegebenen Konzentrationen führte zu keiner nachweisbaren Veränderung der Zellvitalität in der Durchflusszytometrie.

3.2 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Aktivität von Monozyten

In dem folgenden Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Lepirudin auf die Tissue Factor Aktivität der kultivierten humanen Monozyten untersucht. Hierfür wurden sowohl unstimulierte als auch mit LPS zur TF-Expression stimulierte Monozyten untersucht. Es sollte geprüft werden, ob Lepirudin einen Einfluss auf die basale sowie LPS-stimulierte TF-Aktivität ausüben kann. Gleichzeitig wurde untersucht, ob hemmende Effekte abhängig von Inkubationszeitpunkt oder Konzentration von Lepirudin auftreten. Sämtliche verwendeten Medien, Puffer und Lösungsmittel zeigten keine prokoagulatorische Aktivität.

3.2.1 TF-Aktivität unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten

In den Vorversuchen konnte eine maximale Induktion der TF-Aktivität nach sechs bis acht Stunden durch Stimulation mit einer LPS-Konzentration von 10 µg/ml gefunden werden. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte die Induktion der TF-Aktivität in den folgenden vier Versuchsreihen durch Inkubation der Zellen mit 10 µg/ml LPS für sechs Stunden. In Abbildung 15 ist die basale TF-Aktivität unstimulierter Proben jeweils der durch LPS stimulierten TF-Aktivität in den einzelnen Versuchsreihen gegenüber gestellt.

In Abbildung 16 werden die Mittelwerte der vier Versuchsreihen dargestellt. Erwartungsgemäß führte die Stimulation der Monozyten durch LPS in der gewählten Zeit (sechs Stunden) und Konzentration (10 µg/ml) zu einer statistisch signifikanten Steigerung der basalen TF-Aktivität unstimulierter Monozyten von im Durchschnitt

9,35 \pm 1,3 mU/ml (entspricht mU/10⁶ Zellen) auf durchschnittlich 205 \pm 40,9 mU/ml der LPS- stimulierter Monozyten.

Abbildung 15: TF-Aktivität unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten

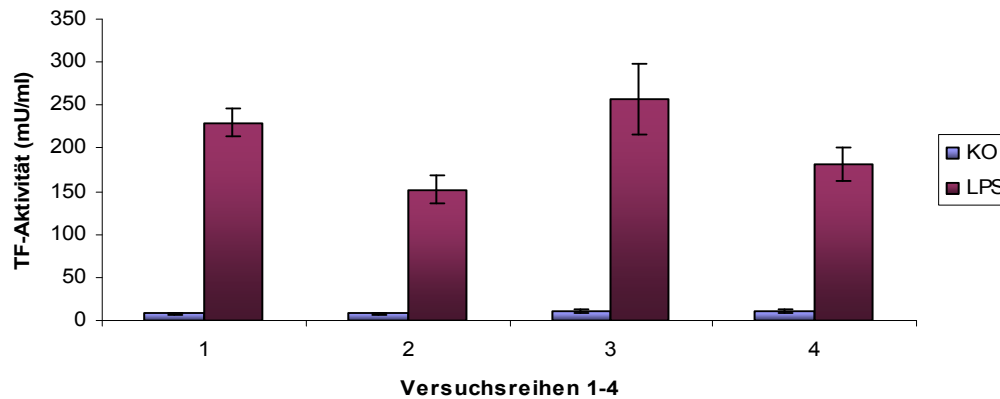


Abb. 15: Darstellung der basalen TF-Aktivität unstimulierter Monozyten (KO) und deren TF-Aktivität nach sechs Stunden Stimulation mit 10 μ g/ml LPS (LPS) in vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

Abbildung 16: Mittelwerte der TF-Aktivität unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten aus vier unabhängigen Versuchsreihen

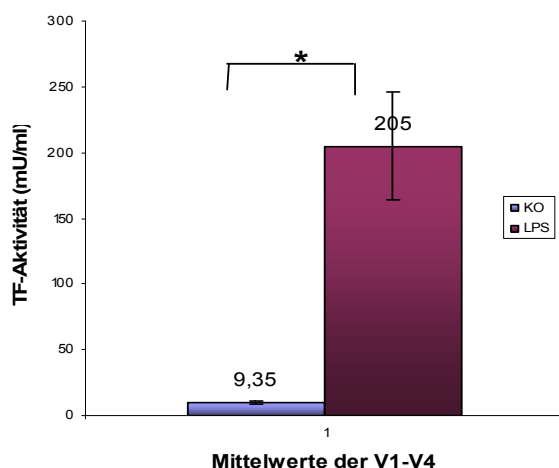


Abb. 16: Graphische Darstellung der durchschnittlichen TF-Aktivität unstimulierter Monozyten (KO) und deren TF-Aktivität nach sechs Stunden Stimulation mit 10 μ g/ml LPS (LPS) in vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen (V1-V4). Dargestellt werden die Mittelwerte aus den vier Versuchsreihen \pm Standardabweichung (n= 4), * p< 0,0001.

3.2.2 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Aktivität unstimulierter Monozyten

Die Inkubation der Monozyten mit Lepirudin (Refludan®) im serumfreien Kulturmedium führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der basalen, unstimulierten TF-Aktivität im Gerinnungstest (Abbildung 17).

Abbildung 17: Reduktion der basalen, unstimulierten TF-Aktivität durch Lepirudin als Funktion der Lepirudin-Konzentration

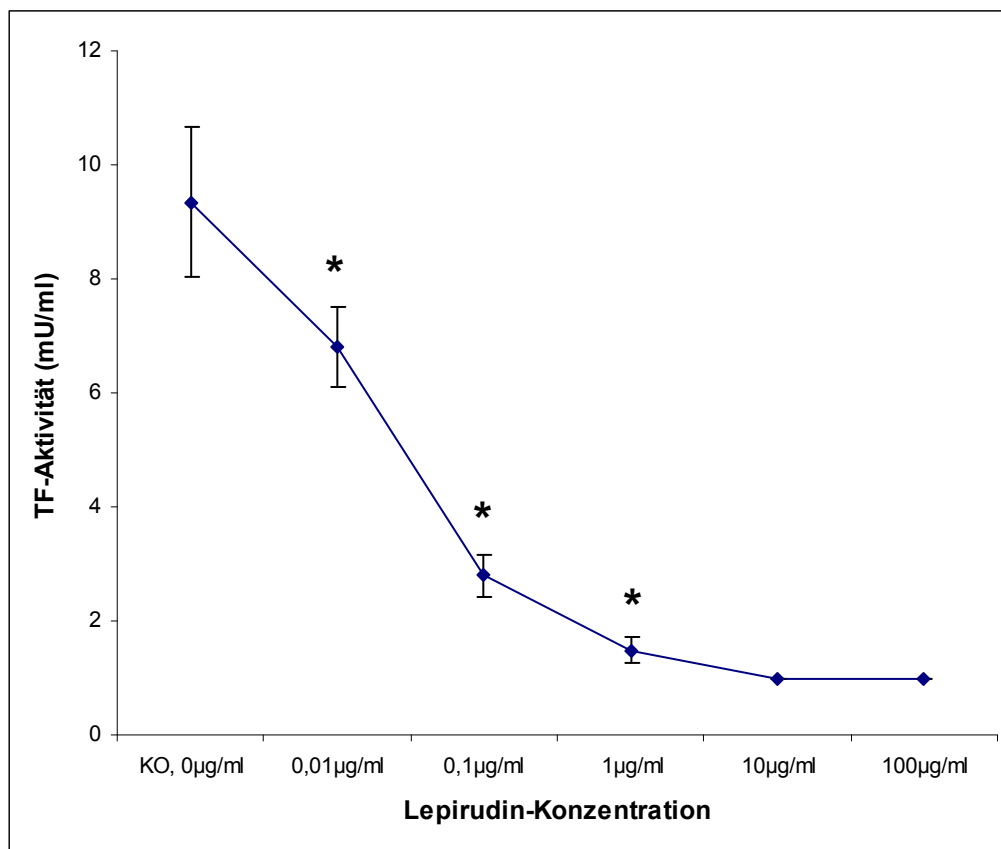


Abb. 17: Darstellung der TF-Aktivität von unstimulierten humanen Monozyten (KO) sowie nach Inkubation mit Lepirudin in den angegebenen Konzentrationen (0-100 µg/ml, entspricht 0-100 µg/10⁶ Zellen) über jeweils acht Stunden. Die prokoagulatorische Aktivität wurde in einem Gerinnungstest bestimmt und in mU/ml (entspricht mU/10⁶ Zellen) angegeben. Ab einer Lepirudin-Konzentration von 10 µg/ml kam es zu einer vollständigen Suppression der basalen TF-Aktivität. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchsreihen (n= 4) angegeben. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt, * p< 0,05 versus Kontrolle.

Anschließend wurden die kultivierten humanen Monozyten mit 0,1 µg/ml sowie 1 µg/ml Lepirudin für 4-18 Stunden inkubiert. Für die gewählten Lepirudin-Konzentrationen konnte zuvor jeweils eine deutliche Reduktion der basalen TF-Aktivität nachgewiesen werden. Eine zeitabhängige Beeinflussung der TF-Aktivität im Gerinnungstest zeigte sich nicht. Die konzentrationsabhängige Reduktion der TF-Aktivität blieb über den gesamten gewählten Zeitraum konstant (Abbildung 18).

Abbildung 18: Einfluss der Inkubationszeit von Lepirudin auf die basale TF Aktivität humaner kultivierter Monozyten

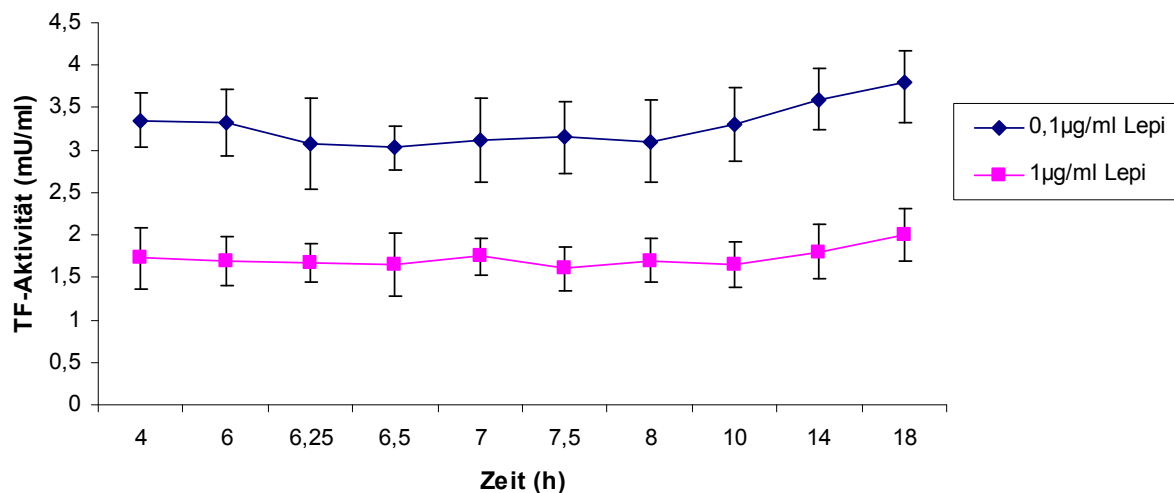


Abb. 18: TF-Aktivität humaner Monozyten, die in den angegebenen Zeiträumen (4-18 Stunden) mit Lepirudin (Lepi) in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml) inkubiert wurden. Die TF-Aktivität wurde in einem Gerinnungstest bestimmt und in mU/ml (entspricht mU/10⁶ Zellen) angegeben. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchsreihen (n= 4) angegeben. Jede Probe einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt.

Die Inkubation der Monozyten mit Lepirudin führte zu einer signifikanten Senkung der basalen TF-Aktivität abhängig von der gewählten Lepirudin-Konzentration. Die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einem Zeitraum von 4-18 Stunden hatte dabei keinen Einfluss auf die Reduktion der TF-Aktivität.

Die Inkubation der Zellen mit Lepirudin in den angegebenen Konzentrationen führte zu keiner nachweisbaren Veränderung der Zellvitalität (Durchflusszytometrie).

3.2.3 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Aktivität LPS-stimulierter Monozyten

Die zuvor ermittelte maximale Stimulation der TF-Aktivität kultivierter humaner Monozyten durch 10 µg/ml LPS (*E. coli* O111:B4) über sechs Stunden konnte durch Inkubation mit Lepirudin (Refludan®) unterschiedlicher Konzentration (jeweils 120 Minuten vor LPS-Stimulation) reduziert werden. Es kam zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der LPS-stimulierten TF-Aktivität im Gerinnungstest (Abbildung 19).

Abbildung 19: Effekte verschiedener Lepirudin-Konzentrationen auf die LPS-induzierte TF-Aktivität in vitro kultivierter Monozyten

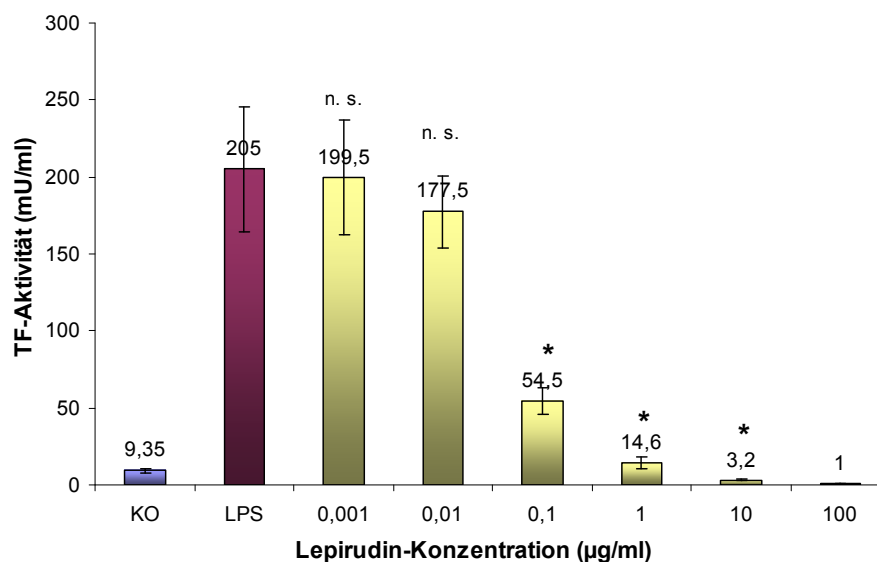


Abb. 19: KO= Kontrolle, unstimulierte Zellen. LPS= für sechs Stunden nur mit LPS (10 µg/ml) stimulierte Zellen. Alle weiteren Proben wurden mit LPS (10 µg/ml) in Gegenwart von Lepirudin in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Zunächst erfolgte eine Inkubation mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration. Nach zwei Stunden wurden die Proben zusätzlich für weitere sechs Stunden mit LPS stimuliert. Die TF-Aktivität der Zellhomogenisate wurde anschließend in einem Gerinnungstest bestimmt. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchsreihen ($n=4$) angegeben, n. s. = nicht signifikant und * $p < 0,05$ jeweils versus nur mit LPS- stimulierten Zellen.

Lepirudin-Konzentrationen von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1 $\mu\text{g/ml}$ führten zu einer statistisch signifikanten Reduktion der TF-Aktivität LPS- stimulierter Zellen.

Wurden die Monozyten in Anwesenheit von 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS über einen Zeitraum von 24 Stunden zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Lepirudin inkubiert, kam es zu einer konstanten Suppression der stimulierten TF-Aktivität (Abbildung 20).

Abbildung 20: Suppression der LPS-induzierten TF-Aktivität durch Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Lepirudin über 24 Stunden

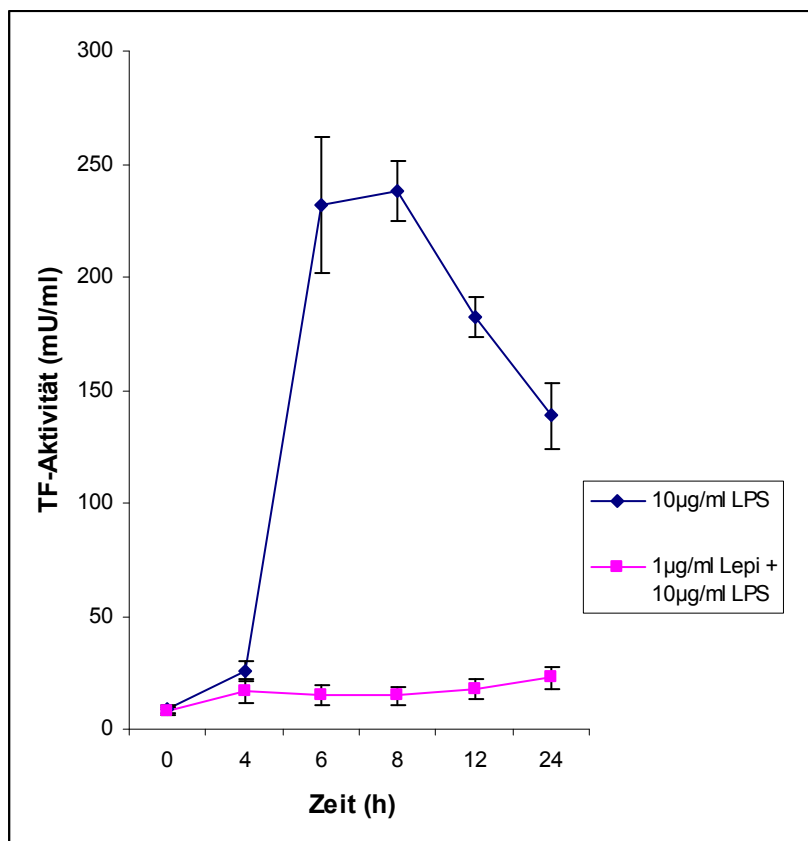


Abb. 20: Die Zellen wurden über 24 Stunden (h) in Anwesenheit von LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Eine Versuchsreihe wurde zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Lepirudin (Lepi) behandelt, eine als Kontrolle nur mit LPS ohne Lepirudin mitgeführt. Die Inkubation wurde zu verschiedenen Zeiten beendet. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen ($n=4$) angegeben.

Der Zeitpunkt der Inkubation mit Lepirudin hatte keinen Einfluss auf die Reduktion der TF-Aktivität im Gerinnungstest. So führte in vier voneinander unabhängigen Versuchen eine Vorinkubation mit 0,1 µg/ml Lepirudin für zwei Stunden vor Zugabe von 10 µg/ml LPS für weitere sechs Stunden zu einer signifikanten Reduktion der TF-Aktivität ($54,5 \text{ mU/ml} \pm 8,8$) gegenüber den nur mit 10 µg/ml LPS für sechs Stunden stimulierten Proben ($205 \text{ mU/ml} \pm 40,9$), $p < 0,05$ versus LPS. Gleiches galt für die dazu gehörenden Versuchsansätze in denen 0,1 µg/ml Lepirudin und 10 µg/ml LPS gleichzeitig für sechs Stunden zu den kultivierten Monozyten gegeben wurde (Lepirudin + LPS $59 \text{ mU/ml} \pm 10,3$, $p < 0,05$ gegenüber LPS $205 \text{ mU/ml} \pm 40,9$). Wurden die Zellen zunächst wie beschrieben mit LPS stimuliert und zwei Stunden nach Zugabe von LPS bzw. vier Stunden vor Ende der Experimente zusätzlich mit 0,1 µg/ml Lepirudin behandelt, führte dies zu annähernd konkrudenten Befunden (LPS+ Lepirudin $68,5 \text{ mU/ml} \pm 13,6$, $p < 0,05$ gegenüber LPS $205 \text{ mU/ml} \pm 40,9$).

In Abbildung 21 wird nochmals der Zusammenhang zwischen Inkubationszeitpunkt mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration und Reduktion LPS-stimulierter TF-Aktivität dargestellt. Hierfür wurde die TF-Aktivität nur LPS-stimulierter Proben (10 µg/ml für sechs Stunden) gleich 100% gesetzt und der prozentualen TF-Aktivität zusätzlich mit Lepirudin zu verschiedenen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Konzentrationen inkubierten Versuchsansätzen gegenübergestellt.

Abbildung 21 A-C: Einfluss des Inkubationszeitpunktes von Lepirudin unterschiedlicher Konzentration auf die LPS-stimulierte TF-Aktivität humaner Monozyten

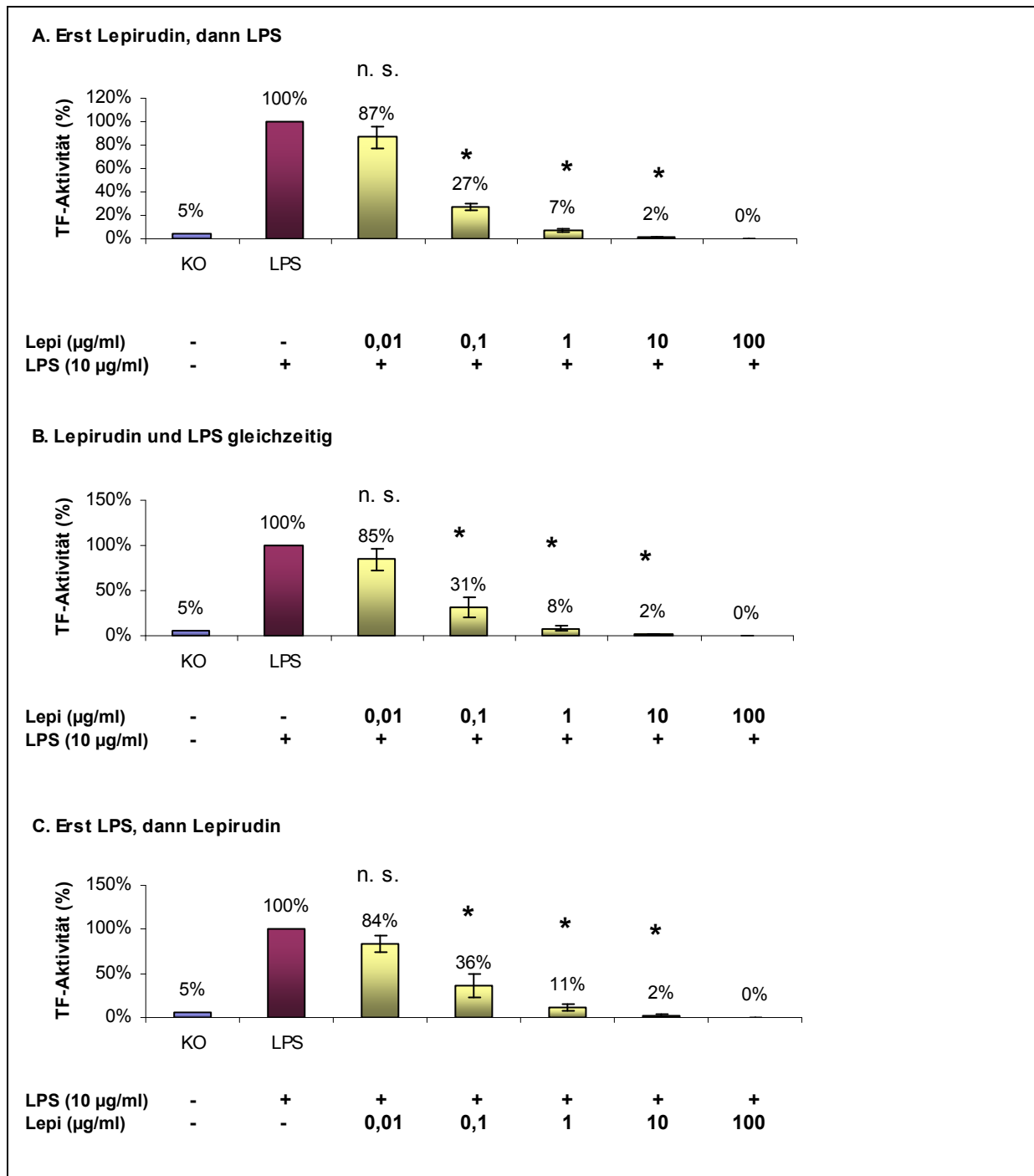


Abb. 21 A-C: Darstellung der Beeinflussung LPS-stimulierter TF-Aktivität (+) humaner Monozyten abhängig vom Inkubationszeitpunkt mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration. Die TF-Aktivität (%) der einzelnen Versuchsansätze wurde der TF-Aktivität nur LPS-stimulierter Proben (100%) gegenübergestellt. KO = Kontrolle, unstimulierte Proben (-). LPS = nur mit LPS (10 µg/ml für sechs Stunden) stimulierte Ansätze. Lepi= Lepirudin (µg/ml).

A: Monozyten wurden 2 h mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration vorinkubiert und anschließend zusätzlich weitere 6 h mit LPS stimuliert.

B: Monozyten wurden gleichzeitig jeweils mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration und LPS für 6 h inkubiert.

C: Monozyten wurden mit LPS vorstimuliert. Nach 2 h wurden die Zellen zusätzlich mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration inkubiert. 6 h nach Beginn der LPS-Stimulation wurden die Experimente beendet.

Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchsreihen (n= 4), * $p < 0,05$ versus LPS-induzierter TF-Aktivität, n. s. = nicht signifikant versus LPS-induzierter TF-Aktivität.

3.2.4 Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität als TF-Aktivität in Faktor VII defizientem Plasma

Die gemessene prokoagulatorische Aktivität im Gerinnungstest konnte als TF-Aktivität charakterisiert werden, da in Faktor VII defizientem Plasma keine Verkürzung der Gerinnungszeit gemessen werden konnte.

Hierfür wurden in ausgewählten Experimenten die Zellen für je sechs Stunden mit LPS unterschiedlicher Konzentration stimuliert und anschließend die prokoagulatorische Aktivität der Zelllysate in Normalplasma als auch Faktor VII defizientem Plasma bestimmt. Alle Werte sind als Mittelwerte von vier unabhängigen Versuchsreihen \pm Standardabweichung angegeben (Tabelle 3).

Tabelle 3: Funktionelle Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität als TF-Aktivität in Faktor VII defizientem Plasma

LPS ($\mu\text{g/ml}$)	Normalplasma, prokoagulatorische Aktivität (mU/ml)	<i>Faktor VII defizientes Plasma, prokoagulatorische Aktivität (mU/ml)</i>
0	8,7 \pm 1,53	8,9 \pm 1,79
0,5	8,8 \pm 1,23	8,9 \pm 2,51
2,5	20 \pm 3,69	8,5 \pm 1,33
5	59 \pm 11,8	6,9 \pm 2,15
7,5	134 \pm 8,03	9,1 \pm 2,17
10	232 \pm 29,8	9,0 \pm 1,48

3.3 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Proteinexpression von Monozyten

Als nächstes wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Lepirudin auf die Tissue Factor Proteinexpression der in vitro kultivierten humanen Monozyten untersucht. Hierfür wurden sowohl unstimulierte als auch mit LPS zur TF-Expression stimulierte Monozyten bearbeitet. Es sollte geprüft werden, ob Lepirudin einen Einfluss auf die basale als auch stimulierte TF-Proteinexpression ausüben kann. Gleichzeitig wurde untersucht, ob hemmende Effekte abhängig von Inkubationszeitpunkt oder Konzentration von Lepirudin auftreten. Sämtliche verwendeten Medien, Puffer und Lösungsmittel zeigten keinen Einfluss auf die Proteinexpression.

3.3.1 TF-Proteinexpression unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten

Die Inkubation der Monozyten mit LPS (*E. coli* O111:B4) im serumfreien Kulturmedium führte zu einer signifikanten Induktion der TF-Proteinexpression im ELISA-Test. In vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen konnte eine durchschnittliche basale TF-Proteinexpression von 78,85 pg/ml \pm 12,6 ermittelt werden. Durch Stimulation mit 10 μ g/ml LPS für sechs Stunden kam es zu einer durchschnittlichen TF-Proteinexpression von 1532 pg/ml \pm 596 (Abbildung 22).

Abbildung 22: Mittelwerte der TF-Proteinexpression unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten aus vier unabhängigen Versuchsreihen

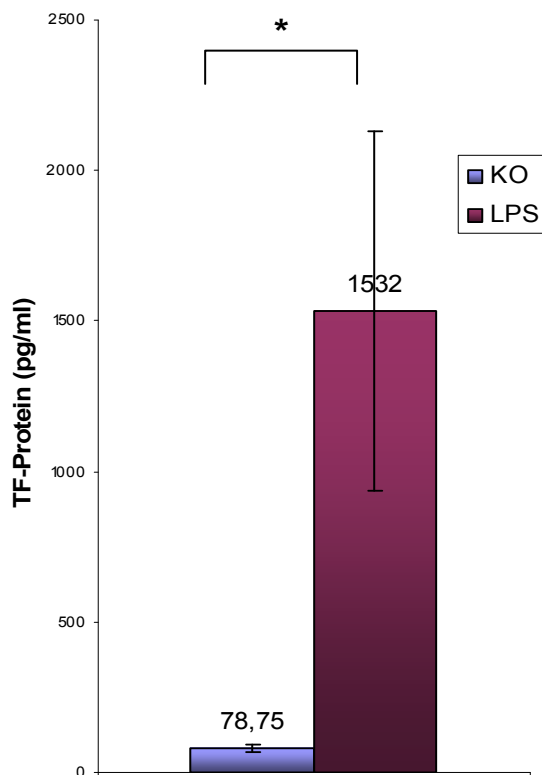


Abb. 22: Graphische Darstellung der durchschnittlichen TF-Proteinexpression unstimulierter Monozyten (KO) und nach sechs Stunden Stimulation mit 10 μ g/ml LPS (LPS) von vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen (n= 4). Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt werden die Mittelwerte aus den vier Versuchsreihen \pm Standardabweichung, * p<0,05 versus unstimulierter Monozyten.

3.3.2 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Proteinexpression unstimulierter Monozyten

Die Inkubation der Monozyten mit Lepirudin (Refludan®) im serumfreien Kulturmedium führte zu einer Reduktion der basalen, unstimulierten TF-Proteinexpression im ELISA-Test (Abbildung 23).

Abbildung 23: Reduktion der basalen, unstimulierten TF-Proteinexpression durch Lepirudin unterschiedlicher Konzentration

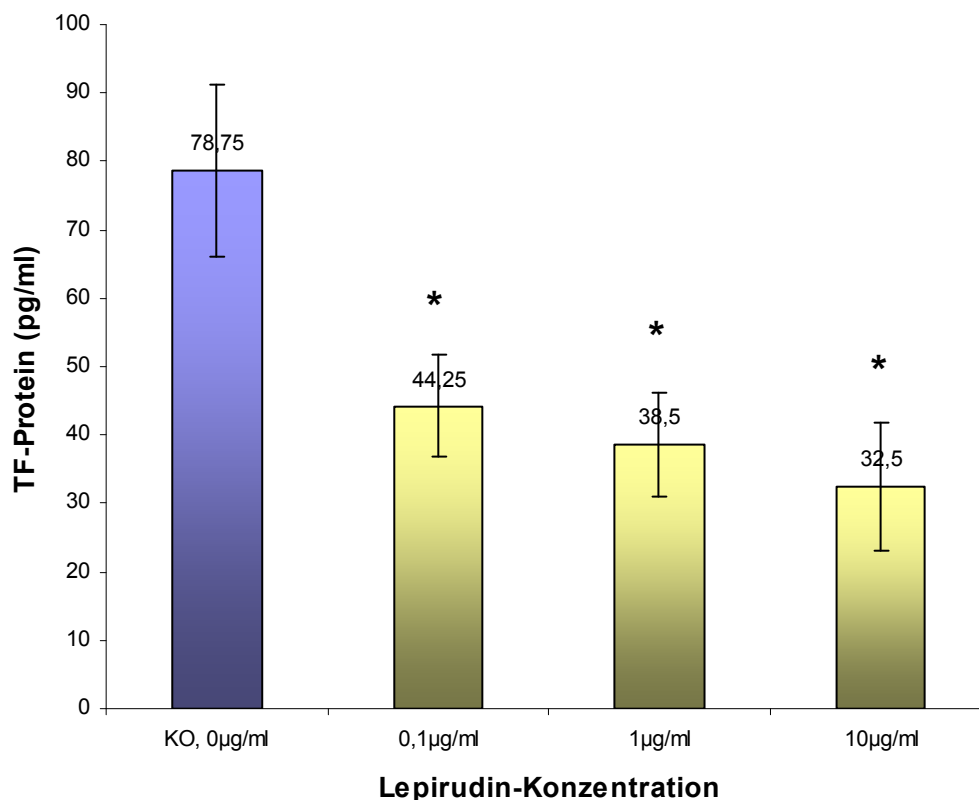


Abb. 23: Darstellung der TF-Proteinexpression unstimulierter humaner Monozyten (KO) sowie nach Inkubation mit Lepirudin in den angegebenen Konzentrationen (0-10 µg/ml, entspricht 0-10 µg/10⁶ Zellen) über jeweils acht Stunden. Die Proteinexpression wurde in einem ELISA-Kit bestimmt und in pg/ml (entspricht pg/10⁶ Zellen) angegeben. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchsreihen (n= 4) angegeben, * p<0,05 versus unstimulierter Kontrolle.

Die Inkubation der Monozyten mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration (0,1-10 µg/ml) führte zu einer signifikanten Senkung der basalen TF-Proteinexpression.

Die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einen Zeitraum von vier bis acht Stunden hatte dabei keinen Einfluss auf die Reduktion der TF-Proteinexpression. Die Reduktion der TF-Proteinexpression blieb über den gesamten gewählten Zeitraum konstant (Abbildung 24).

Abbildung 24: Einfluss der Inkubationszeit von Lepirudin auf die basale TF-Proteinexpression humaner kultivierter Monozyten

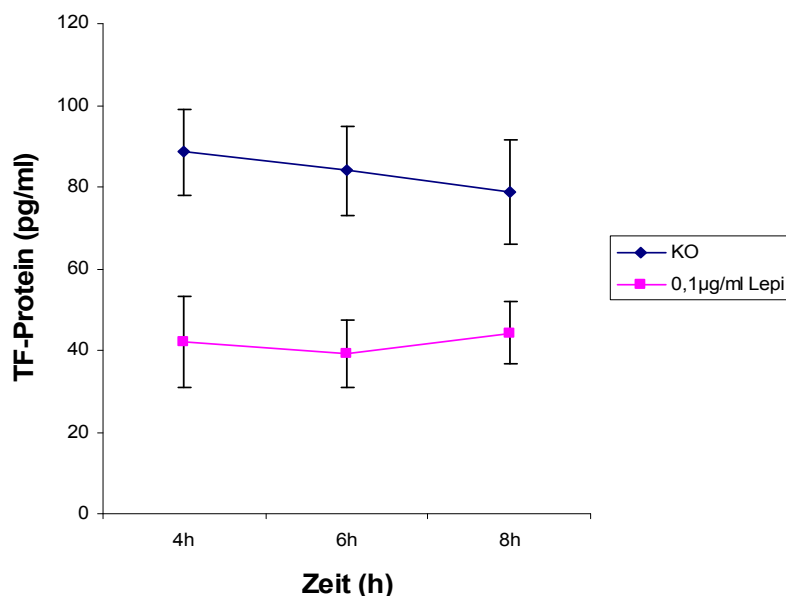


Abb. 24: Die Zellen wurden über 8 Stunden (h) in Anwesenheit von Lepirudin (0,1 µg/ml) inkubiert und eine Versuchsreihe als Kontrolle (KO) ohne jegliche Stimulation mitgeführt. Die Inkubation wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten beendet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchsreihen (n= 4) angegeben. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt.

3.3.3 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Proteinexpression LPS-stimulierter Monozyten

Die zuvor ermittelte maximale Stimulation der TF-Proteinexpression kultivierter humaner Monozyten durch 10 µg/ml LPS (E. coli O111:B4) über sechs Stunden

konnte durch Inkubation mit Lepirudin (Refludan®) unterschiedlicher Konzentration reduziert werden (Abbildung 25).

Abbildung 25: Effekte verschiedener Lepirudin-Konzentrationen auf die LPS-induzierte TF-Proteinexpression kultivierter Monozyten

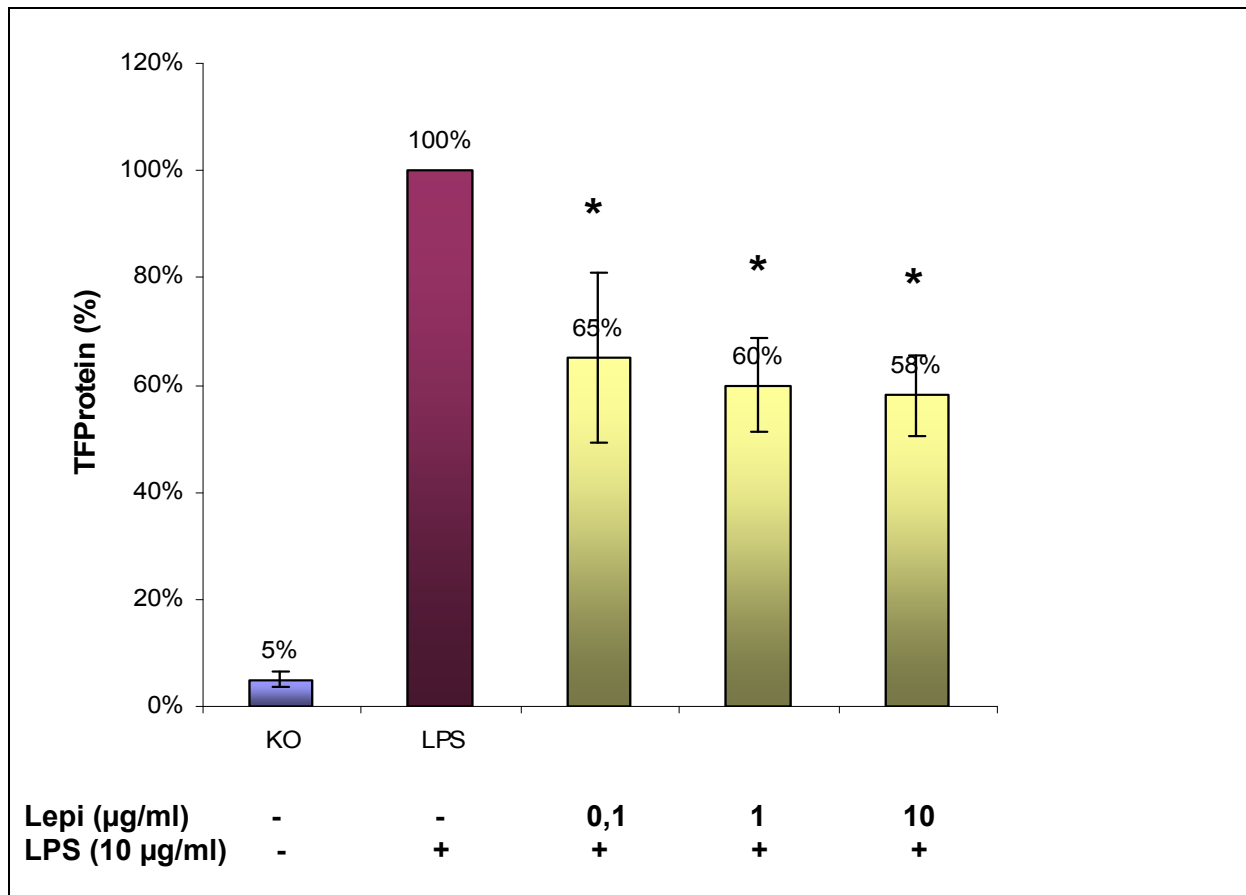


Abb. 25: KO= Kontrolle, unstimulierte Zellen (-). LPS= nur mit LPS (10 µg/ml für sechs Stunden) stimulierte Zellen (+). Alle weiteren Proben wurden mit LPS (10 µg/ml) in Gegenwart von Lepirudin (Lepi) in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Zunächst erfolgte eine Vorinkubation von zwei Stunden mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration. Nach zwei Stunden wurden die Proben zusätzlich für weitere sechs Stunden mit LPS stimuliert. Die TF-Proteinexpression der Zellhomogenisate wurde anschließend in einem ELISA-Test bestimmt und als TF-Proteinexpression (%) der einzelnen Versuchsansätze der TF-Proteinexpression nur LPS-stimulierter Proben (=100%) gegenübergestellt. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier Versuchsreihen (n= 4) angegeben, * $p < 0,05$ versus LPS-induzierter TF-Proteinexpression.

Der Zeitpunkt der Inkubation mit Lepirudin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Reduktion der TF-Proteinexpression im ELISA-Test. So führte in vier voneinander unabhängigen Versuchen eine Vorinkubation mit 1 µg/ml Lepirudin für zwei Stunden vor Zugabe von 10 µg/ml LPS für weitere sechs Stunden zu einer 40%igen Reduktion der TF-Proteinexpression gegenüber den nur mit 10 µg/ml LPS für sechs Stunden stimulierten Proben (100%). Wurden die Zellen gleichzeitig mit LPS und Lepirudin behandelt, führte dies zu einer 28%igen Reduktion der TF-Expression gegenüber den nur mit LPS behandelten Zellen. Wurden die Zellen erst zwei Stunden nach LPS-Stimulation für weitere vier Stunden mit Lepirudin inkubiert, führte dies zu einer 34%igen Reduktion der TF-Proteinexpression (Abbildung 26).

Abbildung 26: Einfluss des Inkubationszeitpunktes von Lepirudin auf die LPS-stimulierte TF-Proteinexpression humaner Monozyten

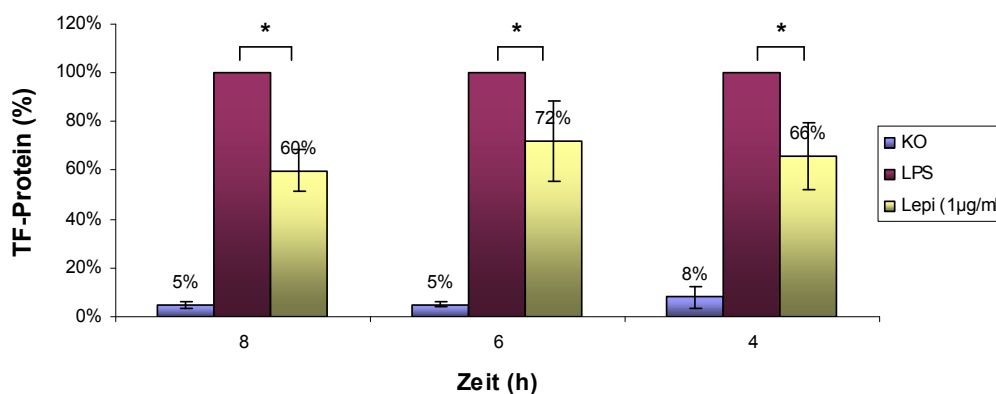


Abb. 26: Unstimulierte Proben wurden in jeder Versuchsreihe als Kontrollen (KO) mitgeführt. 6 h vor Ende der Experimente wurden alle übrigen Proben mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Die TF-Proteinexpression der nur mit LPS stimulierten Proben (LPS) jeder Versuchsreihe wurde gleich 100% gesetzt. Die Zeitangaben 8 h, 6 h und 4 h beziehen sich auf den Zeitpunkt bzw. die Dauer der Inkubation mit Lepirudin (1 µg/ml). In einer Gruppe wurden die Zellen 2 h vor LPS-Stimulation bzw. 8 h vor Ende der Experimente mit Lepirudin vorinkubiert. In der nächsten Gruppe wurden die Monozyten gleichzeitig mit LPS und Lepirudin 6 h vor Ende der Experimente behandelt. Die Zellen der letzten Gruppe wurden 2 h nach LPS-Stimulation bzw. 4 h vor Ende der Experimente mit Lepirudin inkubiert. Jedes Experiment einer Versuchsreihe wurde in Triplikaten durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung von vier Versuchsreihen (n= 4) angegeben, * p<0,05 versus LPS-induzierter TF-Proteinexpression.

3.4 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Gentranskription in Monozyten

Es folgte die Untersuchung, ob neben der Reduktion von TF-Aktivität und TF-Proteinexpression auch die TF-Gentranskription von in vitro kultivierten Monozyten durch Lepirudin beeinflusst wird.

Hierfür wurden sowohl unstimulierte als auch mit LPS zur TF-Gentranskription stimulierte Monozyten bearbeitet. Es wurde geprüft, ob Lepirudin einen Einfluss auf die basale als auch stimulierte TF-mRNA Expression ausüben kann. Gleichzeitig wurde untersucht, ob hemmende Effekte abhängig vom Inkubationszeitpunkt mit unterschiedlicher Lepirudin-Konzentration auftreten. Sämtliche verwendeten Medien, Puffer und Lösungsmittel zeigten keinen Einfluss auf die TF-mRNA Expression.

3.4.1 TF-Gentranskription unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten

Die Inkubation der Monozyten mit LPS (E. coli O111:B4) im serumfreien Kulturmedium führte zu einer signifikanten Induktion der relativen TF-mRNA Expression in der Real-time-RT-PCR (Abbildung 27).

Abbildung 27: Relative TF-mRNA Expression unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten

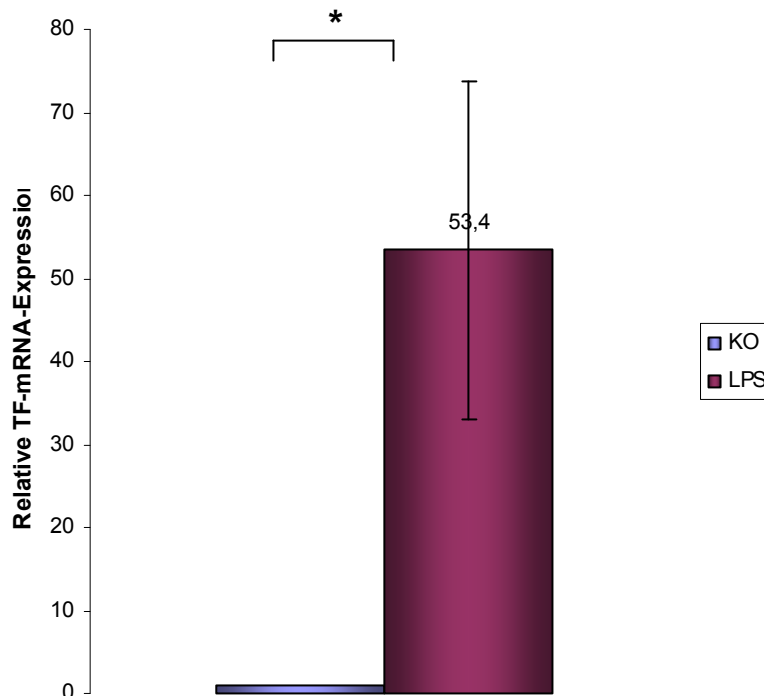


Abb. 27: Graphische Darstellung der durchschnittlichen relativen TF-mRNA Expression unstimulierter Monozyten (KO) und nach vier Stunden Stimulation mit 10 µg/ml LPS (LPS). Alle Werte wurden „normalisiert“ zum internen Referenzgen, dem HKG β-Actin und relativ zu der unstimulierten Kontrolle (KO) berechnet. Dargestellt werden die Mittelwerte ± Standardabweichung aus vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen (n= 4), * p<0,05 versus unstimulierte Monozyten.

3.4.2 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Gentranskription unstimulierter Monozyten

Die Inkubation der Monozyten mit Lepirudin (Refludan®) im serumfreien Kulturmedium führte zu einer Reduktion der basalen, unstimulierten relativen TF-mRNA Expression in der Real-time-RT-PCR (Abbildung 28).

Abbildung 28: Reduktion der basalen, unstimulierten relativen TF-mRNA Expression durch Lepirudin unterschiedlicher Konzentration

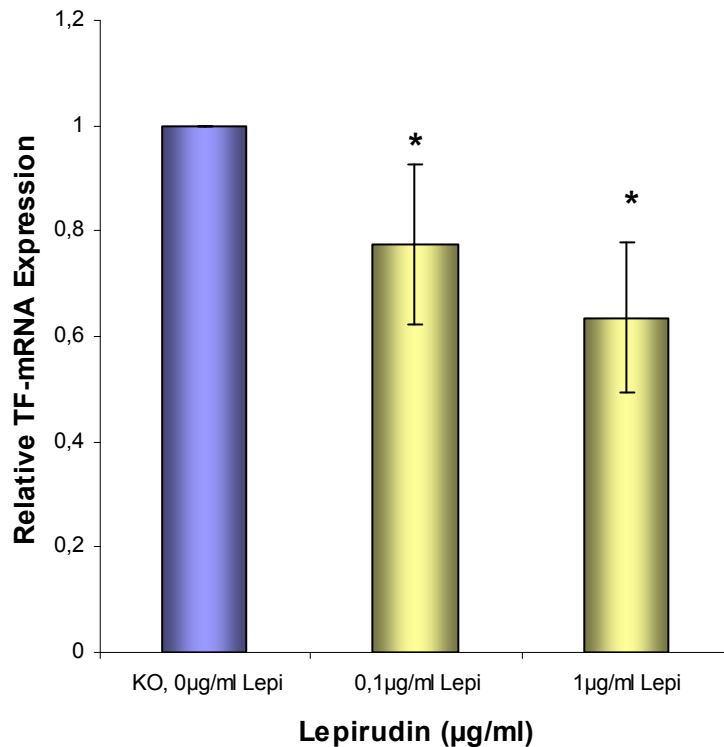


Abb. 28: Darstellung der relativen TF-mRNA Expression unstimulierter humaner Monozyten (KO) sowie nach Inkubation mit Lepirudin in den angegebenen Konzentrationen (0,1 und 1 µg/ml) über jeweils 4 Stunden. Die TF-mRNA Expression wurde mittels Real- time-RT-PCR bestimmt. Alle Ergebnisse wurden „normalisiert“ zu dem HKG β-Actin und relativ zu der unstimulierten Kontrolle (KO) angegeben. Dargestellt werden die Mittelwerte ± Standardabweichung aus fünf voneinander unabhängigen Versuchsreihen (n= 5), * p<0,05 versus unstimulierter Kontrolle.

Die Inkubation der Monozyten mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration (0,1- 1 µg/ml) führte zu einer Reduktion der basalen TF-mRNA Expression.

Die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einem Zeitraum von zwei bis sechs Stunden hatte dabei keinen Einfluss auf die Reduktion der TF-Gentranskription (Abbildung 29).

Abbildung 29: Einfluss der Inkubationszeit von Lepirudin auf die basale relative TF-mRNA Expression humaner kultivierter Monozyten

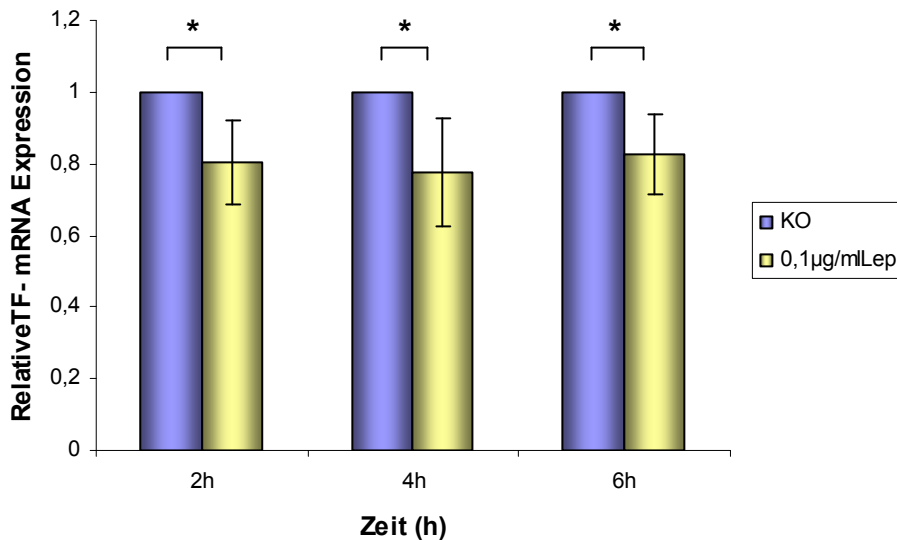


Abb. 29: Die Zellen wurden in Anwesenheit von Lepirudin (0,1 µg/ml) inkubiert oder ohne jegliche Stimulation als Kontrolle (KO) mitgeführt. Die Inkubation wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 2, 4 und 6 h) beendet. Die TF-mRNA Expression wurde mittels Real-time-RT-PCR bestimmt. Alle Ergebnisse wurden „normalisiert“ zu dem HKG β -Actin und relativ zu der unstimulierten Kontrolle (KO) angegeben. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus fünf voneinander unabhängigen Versuchsreihen (n= 5), * $p < 0,05$ versus unstimulierte Zellen.

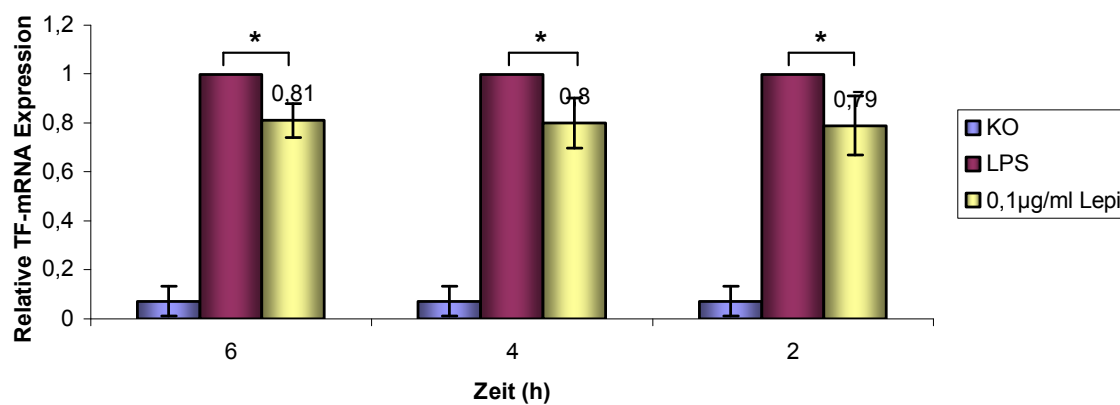
3.4.3 Einfluss von Lepirudin auf die TF-Gentranskription LPS-stimulierter Monozyten

Die zuvor ermittelte signifikante Stimulation der TF-mRNA Expression kultivierter humaner Monozyten mit 10 µg/ml LPS (E. coli O111:B4) über vier Stunden konnte durch Inkubation mit Lepirudin (Refludan®) unterschiedlicher Konzentration reduziert werden (Abbildung 30a und 30b).

Die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einem Zeitraum von zwei bis sechs Stunden und der Inkubationszeitpunkt in Bezug auf die LPS-Stimulation hatten dabei keinen Einfluss auf die Reduktion der TF-Gentranskription (Abbildung 30a und 30b).

Abbildung 30a-b: Einfluss von Lepirudin-Konzentration und -Inkubationszeit auf die LPS-stimulierte relative TF-mRNA Expression humaner Monozyten

a.



b.

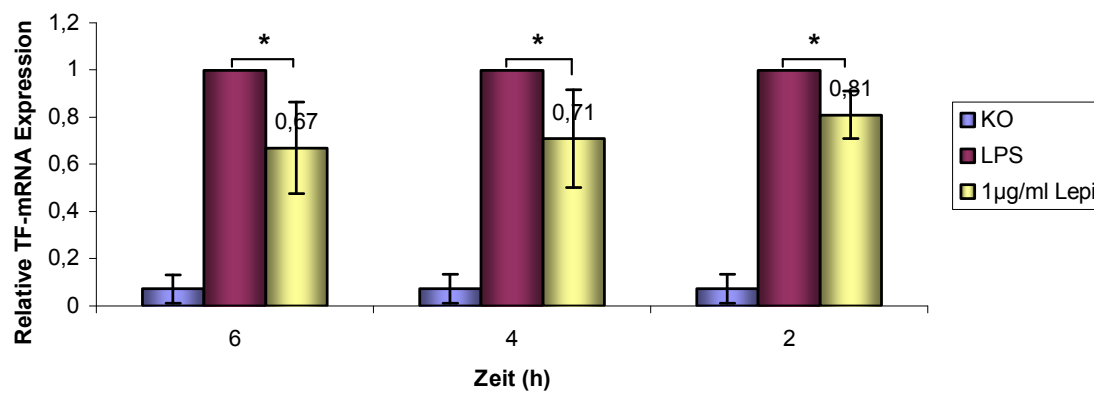


Abb. 30a-b: Darstellung des Einflusses von Lepirudin unterschiedlicher Konzentration (0,1 µg/ml in Abb. 30a, 1 µg/ml in Abb. 30b) auf die LPS-stimulierte relative TF-mRNA Expression humaner Monozyten. Unstimulierte Proben (KO) wurden in jeder Versuchsreihe mitgeführt. Vier Stunden vor Ende der Experimente wurden alle übrigen Proben mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Proben, die nicht zusätzlich mit Lepirudin behandelt wurden (LPS), dienten als Standardprobe. Die Zeitangaben 6 h, 4 h und 2 h beziehen sich auf den Zeitpunkt bzw. die Dauer der Inkubation mit Lepirudin. In einer Gruppe wurden die Zellen zwei Stunden vor LPS-Stimulation bzw. sechs Stunden vor Ende der Experimente mit Lepirudin vorinkubiert. In der nächsten Gruppe wurden die Monozyten gleichzeitig mit LPS und Lepirudin vier Stunden vor Ende der Experimente behandelt. Die Zellen der letzten Gruppe wurden zwei Stunden nach LPS-Stimulation bzw. zwei Stunden vor Ende der Experimente mit Lepirudin inkubiert. Die TF-mRNA Expression wurde mittels Real-time-RT-PCR bestimmt. Alle Ergebnisse wurden „normalisiert“ zu dem HKG β-Actin und relativ zu den nur mit LPS-stimulierten Proben (LPS) angegeben. Dargestellt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus fünf voneinander unabhängigen Versuchsreihen (n= 5), * p<0,05 versus nur mit LPS-stimulierten Zellen.

3.5 Beeinflussung der Ergebnisse durch zusätzliche Gabe von PPACK

Die prokoagulatorische Aktivität im Gerinnungstest wurde durch zusätzliche Gabe von PPACK am Beginn der Stimulationsexperimente nicht beeinflusst. Ebenso konnte keine Beeinflussung der TF-Proteinexpression im TF-ELISA-Test und TF-Genexpression in der Real-time-RT-PCR durch PPACK beobachtet werden.

Zum Beweis hierfür wurden in ausgewählten Experimenten die Zellen für sechs Stunden (TF-Aktivität, TF-Protein) bzw. vier Stunden (TF-mRNA) jeweils mit 10 µg/ml LPS und 10 µg/ml LPS+1 µg/ml Lepirudin stimuliert (Tabelle 4). In Tabelle 4 werden die Ergebnisse der mit PPACK vorbehandelten Proben denen ohne PPACK gegenübergestellt und als Mittelwerte aus vier Versuchsreihen \pm Standardabweichung dargestellt. Ein Einfluss auf die basale unstimulierte TF-Expression durch PPACK wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Ein indirekter Thrombin-Effekt auf die Versuchsergebnisse wurde so ausgeschlossen.

Tabelle 4: Einfluss von PPACK auf prokoagulatorische Aktivität, TF-Proteinexpression und relative TF-mRNA Expression

	Prokoagulatorische Aktivität (mU/ml)	<i>Prokoagulatorische Aktivität (mU/ml) + PPACK</i>
LPS	232 ± 29,8	239 ± 32,4
LPS + Lepi	59 ± 10,3	54 ± 12,6
	TF-Proteinexpression (pg/ml)	<i>TF-Proteinexpression (pg/ml) + PPACK</i>
LPS	1532 ± 596	1562 ± 610
LPS + Lepi	1229 ± 654	1178 ± 598
	Relative TF-mRNA Expression	<i>Relative TF-mRNA Expression + PPACK</i>
LPS	53,4 ± 20,4 *	49,8 ± 28,7 *
<i>LPS + Lepi</i>	0,8 ± 0,1 **	0,8 ± 0,1 **

* Mittelwert ± Standardabweichung aus vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen (n= 4) „normalisiert“ zu dem HKG β-Actin und relativ zu den unstimulierten Zellen.

** Mittelwert ± Standardabweichung aus vier voneinander unabhängigen Versuchsreihen (n= 4) „normalisiert“ zu dem HKG β-Actin und relativ zu den nur mit LPS- stimulierten Zellen.

3.6 Reinheit und Vitalität der Zellkulturen

Der Anteil der Monozyten in den Zellkulturen lag in allen Versuchsansätzen zwischen 90 und 95% (Durchflusszytometrie). Die Zellvitalität der Zellkulturen lag über 90% (Durchflusszytometrie).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lepirudin in Monozyten sowohl die basale als auch LPS-stimulierte Expression von Tissue Factor supprimieren kann. Die Inhibition der Tissue Factor Expression beruhte auf einer verminderten Transkription von TF-mRNA in den mit Lepirudin behandelten Zellen. Funktionell führte die verminderte Tissue Factor Expression der Monozyten nach Inkubation mit Lepirudin dosisabhängig zu einer reduzierten prokoagulatorischen Aktivität, die im Rahmen dieser Arbeit als Tissue Factor Aktivität charakterisiert werden konnte.

4.1 Diskussion von Tissue Factor und Monozyten in der TVP

Die herausragende Stellung von Tissue Factor in der Physiologie der Blutgerinnung ist hinlänglich bekannt und wird aus der Tatsache ersichtlich, dass bislang kein angeborener Mangel an Tissue Factor beschrieben werden konnte. Das Fehlen von Tissue Factor scheint mit dem Leben nicht vereinbar zu sein. Studien mit transgenen Mäusen, bei denen das Gen für Tissue Factor inaktiviert wurde (knock-out Mutanten) zeigten, dass die betroffenen Tiere das Embryonalstadium nicht überleben (18, 117).

Bekannt ist auch, dass jegliche Expression von Tissue Factor innerhalb der Gefäße zur Bindung von Faktor VII und damit zur Aktivierung der Gerinnungskaskade mit Verlagerung des hämostatischen Gleichgewichts von der antikoagulatorischen zur prokoagulatorischen Seite führt (45, 70, 71). Aus diesem Grund sollte eine pathologische Gerinnungsaktivierung im Gefäßbett vermieden werden. Die Tissue Factor Expression von vaskulären Zellen unterliegt nicht zuletzt deshalb einer strikten Reglementierung (26, 69, 74).

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass es in der Initialphase der Transplantatvaskulopathie zur Expression von Tissue Factor durch vaskuläre Zellen wie Monozyten und konsekutiver intravasaler Ablagerungen von Mikrothromben und Fibrin entlang der Gefäßwände kommt (50, 58, 60, 61, 81, 123). Diese Befunde wurden sowohl in transplantierten Herzen als auch Nieren (93) gefunden.

Wichtige Faktoren für die Bildung von Mikrothromben innerhalb des Gefäßbettes sind normalerweise die Denudation des Endothels und die Freilegung von subendotheliale Gewebe, wodurch die Bindung von Thrombozyten über deren Glykoprotein Ib-V-IX-Komplex ermöglicht wird (47). Die Mikrothromben in frühen Stadien der Transplantatvaskulopathie entstehen dagegen auf morphologisch intaktem Endothel. Eine Erklärung hierfür könnte eine pathologische de-novo-Expression von Tissue Factor auf Endothelzellen und adhärenen Monozyten sein, die durch Bindung von Faktor VII zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und Bildung von Mikrothromben führt.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in diesem Zusammenhang in heterotop transplantierten Rattenherzen eine signifikant gesteigerte Tissue Factor Expression entlang der Endothelzellen und auf interstitiellen Monozyten nachweisen, die so in nativen, nicht transplantierten Herzen nicht gefunden wurde (51). Diese Beobachtung wurde von einer amerikanischen Arbeitsgruppe 2002 anhand von Rechtsherzbiopsien herztransplantierter Patienten bestätigt. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte auch eine Korrelation zwischen TF-Expression und der Wahrscheinlichkeit, eine Transplantatvaskulopathie zu entwickeln, herstellen (123).

Klinische Studien, in denen die monozytäre Tissue Factor Expression herztransplantierter Patienten und gesunder Probanden verglichen wurden, zeigten, dass Monozyten herztransplantierter Patienten signifikant mehr Tissue Factor auf ihrer Zelloberfläche exprimierten als gesunde Probanden. Die Monozyten dieser herztransplantierten Patienten wiesen eine höhere Ruheaktivität auf und reagierten auf exogene Stimuli mit einer stärkeren Tissue Factor Expression (52, 53). Die Monozyten herztransplantierter Patienten in diesen Studien erlangten dabei eine TF-Expression, wie sie im Rahmen schwerer inflammatorischer Krankheitsprozesse beobachtet wird.

Diese in vivo beobachtete erhöhte Tissue Factor Expression auf Monozyten herztransplantierter Patienten dürfte verschiedene Ursachen haben.

Monozyten können durch eine Vielzahl von Stimuli zur TF-Expression angeregt werden. C-reaktives Protein, CD40-Ligand, „platelet derived growth factor-BB“ (PDGF-BB), Angiotensin II, „oxidized low density lipoprotein“ (oxLDL) und bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) können die TF-Expression sowohl in zirkulierenden Monozyten als auch in Makrophagen induzieren (67, 68, 69, 113). Einen weiteren Stimulus für Makrophagen stellen proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α und Interferon- γ dar (113). Allgemein geht man heute davon aus, dass das initiale Ereignis bei der Transplantatvaskulopathie auf einer Aktivierung des Gefäßendothels beruht, ausgelöst durch immunologische, inflammatorische, metabolische oder mechanische Faktoren während oder nach der Transplantation (23, 99, 110, 118). Im weiteren Verlauf werden Monozyten rekrutiert, die sich an das aktivierte Gefäßendothel anheften (3, 23, 62, 100). Durch Bindung von $\alpha 4\beta 1$ -Integrinen der Monozyten an Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) der Endothelzellen kann die Tissue Factor Gentranskription und Expression in Monozyten induziert werden (5, 36, 66). Umgekehrt können Monozyten aber auch durch den direkten zellulären Kontakt mit Endothelzellen über Sezernierung von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und „reactive oxygen spezie“ (ROS) eine TF-Expression der Endothelzellen induzieren (87, 113) und damit eine prokoagulatorische Antwort hervorrufen.

Dass ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhter monozytärer Tissue Factor Expression herztransplantierten Patienten und Hämostaseaktivierung besteht, konnte in einer prospektiven klinischen Studie belegt werden, die zeigte, dass eine Suppression der Tissue Factor Expression durch Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktaseinhibitoren (HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren), zu einer Normalisierung der vaskulären Hyperkoagulabilität führt (52).

Durch die Beobachtungen einer persistierenden Hyperkoagulabilität herztransplantierten Patienten und den Fibrin- und Thrombenbildungen entlang der Intima transplanter Gefäße, belegt von verschiedenen Arbeitsgruppen (58, 60, 61, 81), sowie der de-novo Expression von Tissue Factor in den Läsionen der Transplantatvaskulopathie und auf vaskulären Zellen herztransplantierten Probanden (50, 51, 52, 53, 93, 123) ergab sich die Frage, ob durch Modulation der intravasalen Gerinnungsaktivierung die Transplantatvaskulopathie beeinflusst werden kann.

Ausgehend hiervon, könnte eine gezielte Beeinflussung der TF-Expression eine Strategie in Therapie und Prävention der Transplantatvaskulopathie darstellen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte in Tierversuchen durch Behandlung herztransplanterter Ratten mit einem rekombinanten Hirudin (Refludan®) eine Modulation der intravasalen Gerinnungsaktivierung und Reduktion der Transplantatvaskulopathie mit ihrer progredienten Intimaproliferation nach Herztransplantation erzielt werden. Durch die dauerhafte Behandlung der Tiere mit Hirudin (über 120 Tage) konnte sowohl Ausmaß als auch Inzidenz der Transplantatvaskulopathie reduziert werden. Diese Hirudin-induzierte Hemmung der Intimaproliferation ging mit einer reduzierten Tissue Factor-Expression in den transplantierten Gefäßen einher. Ebenso konnte eine verminderte Tissue Factor Gentranskription der mit Hirudin behandelten Tiere nachgewiesen werden (50).

Die Mechanismen, die dieser durch Hirudin-induzierten verminderten Tissue Factor Expression und Gentranskription zugrunde lagen, waren nicht eindeutig zu beantworten. Zum einen wurde vermutet, dass dieser Effekt von Refludan® (Lepirudin) auf einer direkten Hemmung der Tissue Factor Gentranskription beruhen könnte. Diese Eigenschaft war für Hirudine zu diesem Zeitpunkt nicht beschrieben. Wahrscheinlicher schien, dass die beobachtete Reduktion der Tissue Factor Expression und Gentranskription auf einer indirekten Hemmung durch Inaktivierung von Thrombin beruhte. Es war bekannt, dass die Protease Thrombin die Tissue Factor Expression in vaskulären Endothelzellen induzieren (42, 113) und zur Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (43, 72) führen kann. Für rekombinante Hirudine konnte zu diesem Zeitpunkt bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Gefäßmodellen eine Verringerung von Gefäßwandproliferationen und Tissue Factor Expression nach Ballonangioplastie nachgewiesen werden (98, 108). Diese Effekte erklärte man sich ebenfalls durch die bekannte Thrombin-Inhibition der Hirudine.

Ein direkter Einfluss von Lepirudin oder Hirudinen im Allgemeinen auf die Tissue Factor Expression von Monozyten unter Ausschluss von Interaktionen mit Thrombin oder vaskulären Endothelzellen wurde bisher nicht beschrieben.

Die Untersuchungen an den transplantierten Rattenherzen unserer Arbeitsgruppe ließen die Frage offen, ob es sich bei den unter Lepirudin beobachteten Effekten um einen direkten Einfluss des Hirudins auf die Tissue Factor Expression und Gentranskription handelte.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb geklärt werden, ob die in-vivo beobachteten Effekte von Lepirudin auf die Tissue Factor Expression und Gentranskription unter standardisierten, serumfreien Bedingungen wiederholt werden können. Eine Beeinflussung durch Thrombin sollte in dem gewählten Zellkulturmodell ausgeschlossen werden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die Experimente unter serumfreien Bedingungen mit Kulturen aufgereinigter Monozyten durchgeführt. Der Anteil der Monozyten in den Zellkulturen lag in allen Versuchsansätzen zwischen 90 und 95% (Durchflusszytometrie). Interaktionen mit anderen Zellpopulationen wurden durch den hohen Reinheitsgrad der Kulturen ausgeschlossen. Auch die Zellvitalität der kultivierten Monozyten lag über 90% (Durchflusszytometrie). Toxische Effekte von LPS, Lepirudin oder PPACK in den gewählten Konzentrationen konnten ausgeschlossen werden. Aufgrund der serumfreien Kulturbedingungen wurde eine Beeinflussung der Ergebnisse durch im Serum enthaltene interzelluläre Transmitter, Interleukine, Wachstums- und Gerinnungsfaktoren ausgeschlossen.

Die Tissue Factor Induktion der Monozyten erfolgte durch LPS (E. coli O111:B4). Bei LPS handelt es sich um Oberflächenbestandteile gramnegativer Bakterien und einen etablierten inflammatorischen Stimulus humaner Monozyten (114). LPS entfaltet seine Wirkung durch Bindung an CD14-Rezeptoren der Monozyten. Für das Erkennen von LPS durch die Zelle und die Aktivierung einer inflammatorischen und immunologischen Antwort ist ein Komplex von drei verschiedenen Proteinen notwendig. Dazu gehören der „toll-like receptor 4“ (TLR4), der mit dem Protein MD-2 einen Komplex bildet und der CD14-Rezeptor. Erst nach Bindung von LPS an den CD14-Rezeptor kommt es zu einer Assoziation von CD14-Rezeptor und dem TLR4/MD-2-Komplex. Das transmembranöse Protein TLR4 ist dann für die

Signalübertragung in das Zytoplasma verantwortlich (56, 82). Die weitere intrazelluläre Signaltransduktion führt über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Expression des Tissue Factor Gens (48). In der vorliegenden Arbeit konnte nach sechs Stunden Stimulation mit jeweils 10 μ g/ml LPS eine maximale Stimulation der Tissue Factor Proteinexpression erzielt werden. Konkruente Befunde ergaben sich durch Stimulation mit 10 μ g/ml LPS für eine maximale Induktion der Tissue Factor Aktivität. Die maximale Induktion der Tissue Factor mRNA wurde nach vier Stunden Stimulation mit 10 μ g/ml LPS erreicht. Für alle drei Methoden konnte somit eine statistisch signifikante Induktion von Tissue Factor gegenüber unstimulierten Monozyten erzielt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun der Einfluss von Lepirudin unter standardisierten in vitro Bedingungen auf die basale, unstimulierte Tissue Factor Expression der Monozyten untersucht. Gleichzeitig wurde geprüft, ob hemmende Effekte abhängig von Inkubationszeitpunkt oder Konzentration von Lepirudin auftreten.

Die Zellen zeigten dabei eine basale Tissue Factor Proteinexpression von durchschnittlich 78,75 pg/ml, die durch Lepirudin unterschiedlicher Konzentration (0,1, 1 und 10 μ g/ml) nach Inkubation über acht Stunden statistisch signifikant reduziert werden konnte. Durch eine Behandlung mit 0,1 μ g/ml Lepirudin konnte eine Reduktion der basalen Tissue Factor Proteinexpression auf durchschnittlich 44,25 pg/ml erzielt werden. Eine Inkubation mit 1 μ g/ml Lepirudin führte zu einer Reduktion auf durchschnittlich 38,5 pg/ml und damit bereits zu einer über 50%igen Reduktion der basalen Tissue Factor Proteinexpression. Durch Behandlung mit 10 μ g/ml Lepirudin kam es zu einer durchschnittlichen Reduktion der Tissue Factor Proteinexpression auf 32,5 pg/ml (Abbildung 23). Die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einem Zeitraum von vier bis acht Stunden hatte dabei keinen Einfluss auf die Reduktion der Tissue Factor Proteinexpression. Die Reduktion der TF-Proteinexpression blieb über den gesamten gewählten Zeitraum konstant (Abbildung 24).

Konkruent zu der deutlich reduzierten basalen Tissue Factor Proteinexpression

durch Lepirudin konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Reduktion der Tissue Factor Gentranskription der in vitro kultivierten Monozyten nachgewiesen werden. Der Nachweis von Tissue Factor Genexpression erfolgte durch die quantitative Bestimmung von Tissue Factor mRNA mittels Real-time RT-PCR (Real-time reverse transcriptase polymerase chain-reaction) (84,106). Die Tissue Factor mRNA wurde im Rahmen der verwendeten Methodik in Relation zu einem ubiquitär exprimierten „Housekeeping Gen“ angegeben. Hierdurch sollten Expressionsunterschiede, die durch Gewebe und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionskoeffizienten oder Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer Probe, die Zielgen und HKG gleichermaßen betreffen, reduziert werden. Als „Housekeeping Gen“ (HKG) wurde β -Actin verwendet, das ubiquitär und homogen exprimiert wird. β -Actin ist in Mikrofilamenten ein wichtiger Baustein des Zytoskeletts von Zellen und an Zellbewegungen und Protoplasmaströmungen beteiligt. Darüber hinaus wurde die Tissue Factor mRNA-Konzentration einer Probe stets in Bezug zu einer Kontrollprobe gesetzt. Das bedeutet, es wurden nicht die absoluten Tissue Factor mRNA-Konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des Zielgens (Tissue Factor) wurde auf die Expression des HKGs (β -Actin) und eine Kontrollprobe bezogen (siehe auch $\Delta\Delta C_T$ -Methode; 65). Die in dieser Arbeit bestimmten mRNA-Konzentrationen wurden deshalb stets als relative mRNA-Konzentrationen angegeben.

Die Inkubation der Monozyten mit Lepirudin im serumfreien Kulturmedium führte zu einer Reduktion der basalen, unstimulierten relativen Tissue Factor mRNA Expression. Nach vier Stunden Stimulation mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Lepirudin kam es zu einer 22%igen Reduktion der relativen Tissue Factor mRNA Expression unstimulierter Monozyten. Durch die Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Lepirudin konnte eine Reduktion der relativen Tissue Factor mRNA Expression um durchschnittlich 36% bezogen auf die relative Tissue Factor mRNA Expression der unstimulierten Proben erzielt werden (Abbildung 28). Wie bei der Reduktion der Tissue Factor Proteinexpression hatte die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einem Zeitraum von zwei bis sechs Stunden keinen Einfluss auf die Reduktion der Tissue Factor Gentranskription (Abbildung 29).

Beide Methoden wurden unter serumfreien Bedingungen durchgeführt. Der bisher

bekannte Wirkmechanismus von Lepirudin, mit Thrombin einen stöchiometrisch stabilen Komplex einzugehen und dadurch das Enzym zu inhibieren, konnte für die beobachteten Effekte nicht verantwortlich sein. Bekannt ist, dass Thrombin in humanen Endothelzellen eine Tissue Factor Expression induzieren kann (42, 113). Eine Thrombin-induzierte Tissue Factor Expression ist für Monozyten nicht beschrieben. Dennoch sollte in dem gewählten Zellkultumodell eine Thrombin-Beteiligung ausgeschlossen sein, da Thrombin bekannterweise das Zielprotein von Lepirudin ist. In ausgesuchten Versuchsansätzen wurde deshalb zu Beginn der Stimulationsexperimente den Proben der potente, irreversible Thrombin-Inhibitor PPACK (3 U/ml) hinzugefügt. Bei PPACK handelt es sich um ein Chloromethylketon ($C_{21}H_{31}N_6O_3$), das vorhandenes Thrombin binden und dadurch inaktivieren kann. Indirekte Thrombin-Effekte auf die folgenden Stimulationsexperimente sollten so ausgeschlossen werden. Eine Beeinflussung von Tissue Factor Proteinexpression, Gentranskription und Tissue Factor Aktivität durch PPACK wurde nicht beobachtet (Tabelle 4).

Funktionell führte die Inkubation der Monozyten über acht Stunden mit Lepirudin in serumfreien Kulturmedium zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der basalen, unstimulierten Tissue Factor Aktivität im *clotting assay* (Abbildung 17). Lepirudin-Konzentrationen ab 0,01 µg/ml bewirkten eine statistisch signifikante Reduktion der basalen Tissue Factor Aktivität der Zellen. Ab einer Lepirudin-Konzentration von 10 µg/ml kam es zu einer vollständigen Suppression der basalen Tissue Factor Aktivität. Eine zeitabhängige Beeinflussung der Tissue Factor Aktivität im Gerinnungstest zeigte sich auch hier nicht. Die konzentrationsabhängige Reduktion der basalen Tissue Factor Aktivität blieb über den gesamten gewählten Zeitraum von vier bis acht Stunden konstant (Abbildung 18).

Nun wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Lepirudin auf eine LPS-stimulierte Tissue Factor Expression untersucht.

Es zeigte sich, dass die zuvor ermittelte maximale Stimulation der Tissue Factor Proteinexpression kultivierter humaner Monozyten durch 10 µg/ml LPS über sechs Stunden durch Inkubation mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration reduziert werden konnte. Eine Vorinkubation mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration von

zwei Stunden und anschließender zusätzlicher Stimulation für weitere sechs Stunden mit LPS führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der LPS-stimulierten Tissue Factor Proteinexpression. Die Vorstimulation mit 0,1 µg/ml Lepirudin führte zu einer 35%igen Reduktion, 1 µg/ml Lepirudin zu einer 40%igen und 10 µg/ml Lepirudin zu einer 42%igen durchschnittlichen Reduktion der LPS-stimulierten Tissue Factor Proteinexpression (Abbildung 25).

Die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einen Zeitraum von vier bis acht Stunden und der Inkubationszeitpunkt in Bezug auf die LPS-Stimulation hatten dabei keinen Einfluss auf die Reduktion der Tissue Factor Proteinexpression (Abbildung 26).

Die durch Lepirudin reduzierte LPS-stimulierte Tissue Factor Proteinexpression beruhte auf einer entsprechend reduzierten Tissue Factor Genexpression. Die zuvor ermittelte maximale Stimulation der relativen Tissue Factor mRNA Expression durch 10 µg/ml LPS über vier Stunden, konnte durch Inkubation mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration reduziert werden. Auch hier hatte die Dauer der Inkubation mit Lepirudin über einem Zeitraum von zwei bis sechs Stunden und der Inkubationszeitpunkt in Bezug auf die LPS-Stimulation keinen Einfluss auf die Reduktion der Tissue Factor Gentranskription (Abbildung 30a und 30b).

Sowohl die unstimulierte als auch LPS-stimulierte relative Tissue Factor mRNA Expression konnte durch Lepirudin gleichermaßen reduziert werden. Die Inkubation von unstimulierten Monozyten mit 0,1 µg/ml Lepirudin für vier Stunden führte zu einer Reduktion der basalen relativen Tissue Factor mRNA Expression von 22% gegenüber den unstimulierten Kontrollen (Abbildung 29). Wurden die Zellen gleichzeitig mit 0,1 µg/ml Lepirudin und 10 µg/ml LPS für vier Stunden behandelt, führte dies zu einer Reduktion um 20% der relativen Tissue Factor mRNA Expression gegenüber den nur mit LPS-stimulierten Proben (Abbildung 30a).

Der Einfluss von Lepirudin auf die Tissue Factor Expression der in vitro kultivierten humanen Monozyten auf Protein- und Transkriptionsebene konnte sowohl für unstimulierte als auch für LPS-stimulierte Monozyten nachgewiesen werden. Diese Feststellung könnte bedeuten, dass der hier zum Tragen kommende Wirkmechanismus unabhängig von den LPS-induzierten Signaltransduktionswegen der Tissue Factor Expression sein könnte. Eine Beeinflussung des LPS-induzierten Signaltransduktionsweges kann durch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultate allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Es ist bekannt, dass die Transkription des Tissue Factor Gens durch einen 250 Basenpaare langen Genabschnitt oberhalb des 5'-Endes der Transkriptions-initiierungsstelle reguliert wird. Diese Genregion fungiert als Promotor und enthält potentielle Bindungsstellen für AP-1, AP-2, NF- κ B, Sp1 und EGR-1 (34, 68, 71). Dabei handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die nach Stimulation der Zelle in den Zellkern translozieren und dort die Expression bestimmter Gene induzieren können. Heute weiß man, dass die zytokin- und endotoxininduzierte Expression von Tissue Factor in vaskulären Zellen durch die Bindung von Fos/Jun-Heterodimeren an die AP-1-Bindungsstelle und von c-Rel/p65 an die NF- κ B-Bindungsstelle reguliert wird (68, 71). Weitere Untersuchungen könnten klären, ob die im Rahmen dieser Doktorarbeit gemachten Beobachtungen zu einer Beeinflussung dieser Signaltransduktionswege führen.

Funktionell führte eine Vorinkubation der Monozyten für zwei Stunden mit Lepirudin unterschiedlicher Konzentration und anschließender zusätzlicher Stimulation mit 10 μ g/ml LPS zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der LPS-stimulierten Tissue Factor Aktivität im *clotting assay*. Lepirudin-Konzentrationen ab 0,1 μ g/ml bewirkten eine statistisch signifikante Reduktion der LPS-induzierten Tissue Factor Aktivität. Ab einer Lepirudin-Konzentration von 100 μ g/ml kam es zu einer vollständigen Suppression der LPS-stimulierten Tissue Factor Aktivität (Abbildung 19). Eine zeitabhängige Beeinflussung der LPS-stimulierten Tissue Factor Aktivität zeigte sich nicht (Abbildung 20).

Ebenso hatte der Zeitpunkt der Inkubation mit Lepirudin keinen Einfluss auf die Reduktion der TF-Aktivität im Gerinnungstest. So führte eine Vorinkubation mit 0,1 µg/ml Lepirudin für zwei Stunden vor Zugabe von 10 µg/ml LPS für weitere sechs Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Tissue Factor Aktivität um 73% gegenüber den nur mit 10 µg/ml LPS für sechs Stunden stimulierten Proben. Gleiches galt für die dazu gehörenden Versuchsansätze in denen 0,1 µg/ml Lepirudin und 10 µg/ml LPS gleichzeitig für sechs Stunden zu den kultivierten Monozyten gegeben wurden (69%ige Reduktion gegenüber den nur mit LPS stimulierten Zellen). Wurden die Zellen zunächst wie beschrieben mit LPS stimuliert und zwei Stunden nach Zugabe von LPS bzw. vier Stunden vor Ende der Experimente zusätzlich mit 0,1 µg/ml Lepirudin behandelt, führte dies zu annähernd konkruenten Befunden (64%ige Reduktion gegenüber den nur mit LPS stimulierten Zellen) (Abbildung 21 A-C).

Im Unterschied zu der Beeinflussung der basalen Tissue Factor Aktivität durch Lepirudin, die ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml zu einer statistisch signifikanten Reduktion führte, konnten für die LPS-stimulierten Monozyten erst ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml eine statistisch signifikante Reduktion der Tissue Factor Aktivität gemessen werden.

4.3 Wirkmechanismen von Lepirudin

Lepirudin ist ein rekombinantes Hirudin und spezifischer Inhibitor der Proteinase Thrombin, die eine zentrale Stellung in der durch Tissue Factor induzierten plasmatischen Gerinnung einnimmt. Seine Wirkung entfaltet Lepirudin dabei direkt, indem es einen hochaffinen stöchiometrischen Komplex mit Thrombin eingeht, wodurch dessen aktives Zentrum blockiert wird (79, 90; Abb. 5). Thrombin verliert dadurch sowohl seine katalytische Aktivität gegenüber Fibrinogen und anderen Gerinnungsfaktoren (u. a. FXIII) als auch seine Fähigkeit, an Zellrezeptoren zu binden (90, 121).

Seine Wirkungsweise ist unabhängig von Antithrombin III. Der Plättchenfaktor 4 hemmt Lepirudin nicht. Ein Molekül Lepirudin bindet sich an ein Molekül Thrombin und blockiert dabei die thrombogene Wirkung von Thrombin. Daraus ergibt sich,

dass alle Thrombin-abhängigen Gerinnungstests beeinflusst werden, z. B. steigen die aPTT-Werte dosisabhängig (119).

Die Anwendungsgebiete von Lepirudin beschränken sich auf die Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT) Typ II bei Erwachsenen und thromboembolische Erkrankungen, die eine parenterale antithrombotische Therapie erfordern (104).

Laut Hersteller sollte die Anfangsdosis von Lepirudin 0,4 mg/ kg Körpergewicht als Bolus und anschließend 0,15 mg/ kg Körpergewicht/ Stunde als intravenöse Dauerinfusion betragen. Für den klinischen Gebrauch wird empfohlen, dass nach vier Stunden eine Kontrolle und gegebenenfalls Anpassung der Dosis nach einer aPTT-gesteuerten Kontrolle (aPTT-Zielbereich 60-80) erfolgt. Rechnet man die vom Hersteller empfohlenen Dosierungen auf die in der Zellkultur verwendeten Volumina (10^6 Monozyten/ml Kulturmedium) um, entsprächen die vom Hersteller empfohlenen Anfangsdosierungen in etwa einer Lepirudin-Konzentration von 0,001 µg/ml für eine Inkubationsdauer von acht Stunden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings erst ab einer Lepirudin-Konzentration von 0,01 µg/ml für die unstimulierten Monozyten und ab einer Lepirudin-Konzentration von 0,1 µg/ml für die LPS-stimulierten Monozyten eine signifikante Beeinflussung der Tissue Factor Expression festgestellt werden.

Der Hersteller und die Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) empfehlen besondere Vorsichtsmaßnahmen bezüglich der Dauer der Haltbarkeit und für die Aufbewahrung von Lepirudin. Das beinhaltet, dass das einmal gelöste Präparat sofort verwendet werden sollte. Eine längere Aufbewahrung des gelösten Medikaments sollte wegen des auftretenden Wirkverlustes vermieden werden. Ebenso sollte eine Lagerung über 25 °C und das Einfrieren von Lepirudin unterbleiben (104, 119).

Alle Stimulationsexperimente wurden durch mehrmalige Waschvorgänge (2-5x) und das Einfrieren der Proben bei -80 °C für mindestens 72 Stunden beendet. Eine nach dem Auftauungsvorgang weiter bestehende Wirksamkeit von Lepirudin wurde so ausgeschlossen.

Im klinischen Alltag sind Blutungen die häufigste unerwünschte Wirkung von Lepirudin. Sie traten in den bislang durchgeführten klinischen Studien dosisabhängig in bis zu 22% der Fälle auf (91). Davon waren immerhin bis zu 10% transfusionsbedürftig (46), 0,2% waren intrakranielle Blutungen. Diese Raten liegen deutlich über denen von Heparin. Als besonders gefährlich und als nicht zu überschreiten wird eine mehr als 3fach verlängerte aPTT vom Hersteller (Hoechst Marion Roussel) genannt.

Als Gründe für die häufigen Blutungskomplikationen wurden bisher die extrem starken Bindungen von Lepirudin an Thrombin und die dadurch quasi irreversible Thrombinhemmung verantwortlich gemacht (27).

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit gibt es zumindest in vitro noch einen weiteren Wirkmechanismus. Wie gezeigt werden konnte, kann Lepirudin dosisabhängig in humanen Monozyten die basale als auch stimulierte Expression von Tissue Factor durch Inhibition der Tissue Factor mRNA Transkription beeinflussen. Funktionell führte diese verminderte Tissue Factor Expression der Monozyten durch Lepirudin dosisabhängig zu einer reduzierten prokoagulatorischen Aktivität, die im Rahmen dieser Arbeit als Tissue Factor Aktivität charakterisiert werden konnte.

4.4 Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse konnten erstmals zeigen, dass Lepirudin in kultivierten Monozyten sowohl die basale als auch durch LPS-stimulierte Tissue Factor Aktivität dosisabhängig reduzieren kann. Verantwortlich für diese Beobachtungen konnte eine verminderte Tissue Factor Proteinexpression, resultierend aus einer verminderten Tissue Factor Gentranskription gemacht werden. Die intrazellulären Signaltransduktionswege, die zu der Inhibition der Tissue Factor Gentranskription durch Lepirudin führten, sind noch ungeklärt.

Der bekannte Wirkmechanismus von Lepirudin, die direkte Thrombin-Inhibition, konnte im Zellkulturmodell ausgeschlossen werden.

Weitere Studien könnten klären, ob Lepirudin nach Herztransplantationen die lokale Gerinnungsaktivierung beeinflussen kann und dadurch präventiv bei der Pathogenese der Transplantatvaskulopathie wirkt.

Darüber hinaus könnte untersucht werden, ob der Einsatz von Lepirudin ebenfalls bei anderen, mit einer pathologisch gesteigerten Tissue Factor Expression assoziierten Erkrankungen sinnvoll ist.

5 Publikation

Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Februar 2004 als Abstract und Poster auf der 48. Tagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung in Hamburg, Deutschland, vorgestellt.

6 Zusammenfassung

Der limitierende Faktor für das Langzeitüberleben herztransplantierte Patienten ist die Transplantatvaskulopathie. Verschiedene Studien haben darauf hingewiesen, dass eine Aktivierung des Gerinnungssystems in der Pathogenese der Transplantatvaskulopathie neben immunologischen und inflammatorischen Faktoren eine Rolle spielt. Aktivierte Monozyten können im stimulierten Zustand durch die Expression von Tissue Factor eine hohe prokoagulatorische Aktivität aufweisen und dadurch direkt für die in den betroffenen Gefäßen beobachtete lokale Fibrinablagerung verantwortlich gemacht werden (50, 61, 68).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Lepirudin auf die Tissue Factor Expression humaner Monozyten untersucht. Lepirudin ist ein rekombinantes Hirudin und spezifischer Inhibitor der Proteinase Thrombin. Die Experimente wurden unter serumfreien Bedingungen mit Kulturen aufgereinigter humaner Monozyten durchgeführt. Untersucht wurde sowohl der Einfluss von Lepirudin auf die basale, unstimulierte als auch auf die durch LPS stimulierte Tissue Factor Expression der Monozyten.

Es konnte gezeigt werden, dass Lepirudin in humanen Monozyten sowohl die basale als auch LPS-stimulierte Tissue Factor Proteinexpression supprimieren kann. Die Inhibition der Tissue Factor Expression beruhte auf einer verminderten Transkription von TF-mRNA in den mit Lepirudin behandelten Zellen. Funktionell führte die verminderte Tissue Factor Expression der Monozyten nach Inkubation mit Lepirudin dosisabhängig zu einer reduzierten prokoagulatorischen Aktivität, die im Rahmen dieser Arbeit als Tissue Factor Aktivität charakterisiert werden konnte. Die basale Tissue Factor Aktivität konnte durch Lepirudin ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml statistisch signifikant reduziert werden. In den LPS-stimulierten Monozyten führte erst eine Konzentration von 0,1 µg/ml zu einer statistisch signifikanten Reduktion. Die intrazellulären Signaltransduktionswege, die zu der Inhibition der Tissue Factor Gentranskription durch Lepirudin führten, sind noch ungeklärt. Der bekannte Wirkmechanismus von Lepirudin, die direkte Thrombin-Inhibition, konnte im Zellkulturmodell ausgeschlossen werden.

7 Summary

The limited factor for long-term survival of heart-transplanted patients is transplant vasculopathy. Various studies have indicated that, apart from immunological and inflammatory factors, activating the coagulation system plays a role in the pathogenesis of transplant vasculopathy. Under stimulated condition induced by expressed tissue factor, activated monocytes are able to exhibit a higher pro-coagulated activity and can thus be made directly responsible for local fibrin accretion observed in affected vessels (50, 61, 68).

This thesis investigated the effect of lepirudin on tissue factor expression of human monocytes. Lepirudin is a recombinant hirudin and specific inhibitor of thrombin protein. The experiments were performed under serum-free conditions with cultures of purified human monocytes. The influence of lepirudin was examined on basic, non-stimulated as well as LPS-stimulated tissue factor expression of the monocytes.

It was demonstrated that lepirudin in human monocytes is able to suppress basic and also LPS-stimulated tissue factor protein expression. Inhibition of tissue factor expression is based on a decreased transcription of TF-mRNA in the lepirudin-treated cells. After incubation with lepirudin, the tissue factor expression of monocytes functionally leads to a dose-dependently reduced procoagulatory activity, this was able to be characterised as tissue factor activity in this work. The fundamental tissue factor activity was able to be statistically significantly reduced by a lepirudin concentration of 0,01 µg/ml. In the LPS-stimulated monocytes, only a concentration of 0,1 µg/ml was able to cause a statistically significant reduction. The intracellular signal transduction paths, which lead to the inhibition of the tissue factor gene transcription through lepirudin, are still not clear. The familiar working mechanism of lepirudin, which is direct thrombin inhibition, was excluded in the cell culture experiment.

8 Literaturverzeichnis

- 1) Afshar-Kharghan V, Thiagarajan P. Leukocyte adhesion and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2006; 13(1): S 34-9.
- 2) Ahamed J, Ruf W. Protease-activated receptor 2-dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 2004; 279(22): S 23038-44.
- 3) Akio Saiura, Masataka Sata, Ken-ichi Hiasa, Shiro Kitamoto, Miwa Washida, Kensuke Egashira, Ryoza Nagai, Masatoshi Makuuchi. Antimonocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attenuates Graft Vasculopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2004; 24: S 1886.
- 4) Albrecht S, Kotzsch M, Siegert G, Luther T, Grossmann H, Grosser M, Müller M. Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population. *Thromb Haemost* 1996; 75(5): S 772-7.
- 5) Al-Saady N M, Leatham E W, Gupta S, Kwan J T C, Eastwood J B, Seymour C A . Monocyte expression of tissue factor and adhesion molecules: the link with accelerated coronary artery disease in patients with chronic renal failure. *Heart* 1999; 81: S 134-140.
- 6) Annex Brian H, MD; Denning Stephen M, MD; Channon Keith M, MRCP; Sketch Michael H, Jr, MD; Stack Richard S, MD; Morrissey James H, PhD; Peters Kevin G, MD. Differential expression of tissue factor protein in directional atherectomy specimens from patients with stable and unstable coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91: S 619-622.
- 7) Bach RR, Gentry R, Nemerson Y. Factor VII binding to tissue factor in reconstituted phospholipid vesicles: induction of cooperativity by phosphatidylserine. *Biochemistry* 1986; 25: S 40007-40020.
- 8) Banner DW, D'Arcy A, Chene C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 1996; 380: S 41-46.

- 9) Bazan JF. Biochemistry Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; Vol. 87: S 6934-6938.
- 10) Belting M, Dorrell MI, Sandgren S, Aguilar E, Ahamed J, Dorfleutner A, Carmeliet P, Mueller BM, Friedlander M, Ruf W. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signalling. *Nat Med* 2004; 10 (5): S 502-9.
- 11) Billingham ME. Pathology of graft vascular disease after heart and heart-lung transplantation and its relationship to obliterative bronchiolitis. *Transplant Proc.* 1995 Jun; 27 (3): S 2013-6.
- 12) Billingham ME. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart and Lung Transplant.* 1992; 11: S 38-44.
- 13) Bode W, Stubbs MT. Struktur und Funktion des Thrombins. Hämostaseologie. *Springer Verlag, Heidelberg* 1998: S 269-284.
- 14) Bokarewa MI, Morrissey JH, Tarkowsky A. Tissue factor as a proinflammatory agent. *Arthritis Res* 2002; 4: S 190–195.
- 15) Bøyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood, Isolation of monuclear cells by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968; 97: S 77-89.
- 16) Camerer E, Kolsto A, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thrombosis Research* 1996; 81: S 1-41.
- 17) Carmeliet P, Collen D. Molekules in focus – Tissue factor. *Int. J Biochem Cell Biol.* 1998; 30: S 661-667.
- 18) Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier G, Evrard P, Müller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383(6595): S 73-5.

- 19) Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res* 2004; 95(9): S 858-66.
- 20) Chomczynski, P, Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: S 156–159.
- 21) Christersson C, Johnell M, Siegbahn A. The Influence of Direct Thrombin Inhibitors on the Formation of Platelet-leukocyte Aggregates and Tissue Factor Expression. *Thromb Res.* 2010 May 6; [Epub ahead of print].
- 22) Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, Pietra A, Locati D, Donati MB, Semeraro N. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest.* 1983; 71(6): S 1893-6.
- 23) Conraads V, Lahaye I, Rademakers F, Heuten H, Rodrigus I, Vrints C, Moulijn A. Cardiac graft vasculopathy: aetiologic factors and therapeutic approaches. *Acta Cardiol.* 1998; 53 (1): S 37-43.
- 24) Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: Correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med.* 1996; 2: S 209–215.
- 25) Coughlin SR: Protease-activated receptors in vascular biology. *Thromb Haemost* 2001; 86: S 298–307.
- 26) Davie EW, Fujikawa KA, Kiesel W. The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry* 1991; 30: S 10363-70.
- 27) Di Nisio M, Middeldorp S, Büller HR. Direct thrombin inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: S 1028-1040.
- 28) Dorfleutner A, Ruf W. Regulation of tissue factor cytoplasmic domain phosphorylation by palmitoylation. *Blood* 2003; 102(12): S 3998-4005.

- 29) Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues, Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989;134(5): S 1087-97.
- 30) DSO (Deutsche Stiftung Organtransplantation): Gemeinnützige Stiftung, Koordinierungsstelle Organspende, www.dso.de, Index, Jahresbericht 2009, CTS (Collaborative Transplant Study): S 42, Abb. 32 (Recherchedatum 11.05.2010).
- 31) DSO (Deutsche Stiftung Organtransplantation): Gemeinnützige Stiftung, Koordinierungsstelle Organspende, [www.dso.de/Transplantation/Organtransplantation/ Herztransplantation](http://www.dso.de/Transplantation/Organtransplantation/Herztransplantation) (Recherchedatum 11.05.2010).
- 32) Dvorak HF. Thrombosis and cancer. *Hum Pathol* 1987; 18(3): S 275-84.
- 33) Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coag Fibrinol* 2004; 15: S 521-538.
- 34) Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost.* 1991; 66: S 67-79.
- 35) Estep JD; Shah DJ; Nagueh SF; Mahmarian JJ; Torre-Amione G; Zoghbi WA. The role of multimodality cardiac imaging in the transplanted heart. *JACC. Cardiovascular imaging* 2009; VOL: 2 (9): S 1126-40.
- 36) Fan ST, Mackman N, Cui MZ, Edgington TS. Integrin regulation of an inflammatory effector gene. Direct induction of the tissue factor promoter by engagement of beta 1 or alpha 4 integrin chains. *J Immunol* 1995;154 (7): S 3266-74.
- 37) Fisher KL, Gorman CM, Vehar GA, O'Brien DP, Lawn RM. Cloning and expression of human tissue factor cDNA. *Thromb Res* 1987; 48(1): S 89-99.
- 38) Fleck RA, Rao LV, Rapaport SI, Varki N. Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody. *Thromb Res* 1990; 59(2): S 421-37.

- 39) Flössel C, Luther T, Albrecht S, Kotzsch M, Müller M. Constitutive tissue factor expression of human breast cancer cell line MCF-7 is modulated by growth factors. *Eur J Cancer* 1992; 28A (12): S1999-2002.
- 40) Flössel C, Luther T, Müller M, Albrecht S, Kasper M. Immunohistochemical detection of tissue factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue. *Histochemistry* 1994; 101 (6): S 449–453.
- 41) Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis: Evolving concepts. *Circulation* 1990; 82 (3): S II47-59.
- 42) Galdal KS, Lyberg T, Evensen SA. Thrombin induces thromboplastin synthesis in cultured vascular endothelial cells. *Thromb Haemost* 1985; 54: S 373–376.
- 43) Gasic GP, Arenas CP, Gasic TB, Gasic GJ. Coagulation factors X, Xa, and protein S as potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: S 2317–2320.
- 44) Giesen PLA, Ursula Rauch, Bernd Bohrmann, Dorothee Kling, Merce Roqué, John T. Fallon, Juan J. Badimon, Jacques Himber, Markus A. Riederer, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96 (5): S 2311–2315.
- 45) Girardi G, Mackmann N. Tissue factor in antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss: a pro-inflammatory molecule. *Lupus* 2008 October; 17(10): S 931-936.
- 46) Greinacher, A., et al. GUSTO 2b: *N. Engl. Med.* 1996; 335: S 775; *Hematology* 1997; 74 Suppl II, A 97:
- 47) Hawiger J. Platelet-vessel wall interactions. Platelet adhaesion and aggregation. Prevention and noninvasiv therapy of atherosclerosis. *Atherosclerosis Reviews* 1990; 21: S 165-186.

- 48) Hawiger Jacek, Veach Ruth Ann, Liu Xue-Yan, Timmons Sheila and Ballard Dean W. I κ B Kinase Complex Is an Intracellular Target for Endotoxic Lipopolysaccharide in Human Monocytic Cells. *Blood* 1999; 94 (5): S 1711-1716.
- 49) Helin H, Edgington TS. Allogenic induction of the human Tcell.instructed monocyte procoagulant response is rapid and is elicited by HLA-DR. *J Exp Med* 1983; 158: S 962-975.
- 50) Hölschermann et al. Hirudin Reduces Tissue Factor Expression and Attenuates Graft Arteriosclerosis in Rat Cardiac Allografts. *Circulation* 2000; 102 (3): S 357-363.
- 51) Hölschermann H, Bohle RM , Zeller H, Schmidt H , Stahl U, Fink L , Grimm H, Tillmanns H, Haberbosch H. In Situ Detection of Tissue Factor within the Coronary Intima in Rat Cardiac Allograft Vasculopathy. *American Journal of Pathology* 1999; 154: S 211-220.
- 52) Hölschermann H, Hilgendorff A, Kemkes-Matthes B, Schönburg M, Bauer EP, Tillmanns H, Haberbosch W. Simvastatin attenuates vascular hypercoagulability in cardiac transplant recipients. *Transplantation* 2000; 69: S 1830-1836.
- 53) Hölschermann H, MD; Kohl Oliver, MD; Maus Ulrich, PhD; Dürfeld Frank, MD; Bierhaus Angelika, PhD; Nawroth Peter P., MD; Lohmeyer Jürgen, MD; Tillmanns Harald, MD; Haberbosch Werner, MD. Cyclosporin A Inhibits Monocyte Tissue Factor Activation in Cardiac Transplant Recipients. *Circulation* 1997; 96: S 4232-4238.
- 54) Hugel Bénédicte, Martinez M. Carmen, Kunzelmann Corinne and Freyssinet Jean-Marie. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology* 2005; 20 (1): S 22-27.
- 55) International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) Introduction and General Statistics 2008, www.isHLT.org/downloadables/introduction.ppt (Recherchedatum: 21.01.2010).
- 56) Janeway Charles A., Jr. and Medzhitov Ruslan. Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: S 197–216.

- 57) Kushak RI, Nestoridi E, Lambert J, Selig MK, Ingelfinger JR, Grabowski EF. Detached endothelial cells and microparticles as sources of tissue factor activity. *Thromb Res* 2005; 116(5): S 409-19.
- 58) Labarrere CA, Abellada GC. Vascular anticoagulation and transplant coronary artery disease. *Z Kardiol* 2000; 89 Suppl 9: S IX/32-5.
- 59) Labarrere CA. Anticoagulation factors as predictors of transplant-associated coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: S 623-33
- 60) Labarrere CA, Nelson DR, Faulk WP Myocardial fibrin deposits in first month after transplantation predict subsequent coronary artery disease and graft failure in cardiac allograft recipients. *Am J Med* 1998; 105: S 207-13
- 61) Laberre CA, Ortiz MA, Ruzmetow N, Sosa MJ, Campana G, Terry C, Baldrige LA, Antonopoulos R, Di Carlo HL. Microvascular thrombosis and cardiac allograft vasculopathy in rat heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2006: S 1213-22.
- 62) Lepage S, Cailhier JF. Chronic transplant vasculopathy microenvironment present in the renal allograft reprograms macrophage phenotype. *Transplant Proc*. 2009; 41(8): S 3311-3.
- 63) Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *Intern Med* 2008; 263(5): S 528-37.
- 64) Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ. Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA*. 1993; 270(8): S 975-9.
- 65) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): S 402-8.
- 66) Lo SK, Cheung A, Zheng Q and Silverstein RL. Induction of tissue factor on monocytes by adhesion to endothelial cells. *The Journal of Immunology* 1995, Vol 154, Issue 9: S 4768-4777.

- 67) Lupu C, Westmuckett AD, Peer G, Ivanciu L, Zhu H, Taylor FB Jr, Lupu F. Tissue factor-dependent coagulation is preferentially up-regulated within arterial branching areas in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *Am J Pathol.* 2005; 167(4): S 1161-72.
- 68) Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Thromb Haemost.* 1997; 78(1): S 747-54.
- 69) Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24: S 1015–1022.
- 70) Mackman N. The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis. *Anesth Analg.* 2009 May; 108(5): S 1447-1452.
- 71) Mackman N, Taubman M. Tissue Factor Past, Present and Future. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 December; 29(12): 1986-1988.
- 72) McNamara CA, Sarenbock IJ, Gimple LW, Fenton II JW, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest* 1993; 91: S 94–98.
- 73) Märki WE, Wallis RB. The anticoagulant and antithrombotic properties of hirudins. *Thromb Haemost* 1990; 64(3): S 344-8.
- 74) Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LVM. Cellular localization and trafficking of tissue factor. *Blood* 2006; Vol. 107, No. 12: S 4746-4753.
- 75) Mandal SK, Pendurthi UR, Rao LVM. Tissue factor trafficking in fibroblasts: involvement of protease-activated receptor-mediated cell signalling. *Blood* 2007; 110 (1): S 161-170.
- 76) Mann KG, Brummel. Ziedins K, Orfeo T, Butenas S. Models of blood coagulation. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36 (2): S 108-17.
- 77) Mao F, Wai-Yee Leung W-Y, Xin X. Characterization of EvaGreen and the implication of its physicochemical properties for qPCR applications. *BMC Biotechnology* 2007; 7: S 76.

- 78) Markward F. Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Hoppe Seyler Z Physiol Chem* 1957; 308: S 147-156.
- 79) Markwardt F. Hirudin as an Inhibitor of Thrombin. *Methods Enzymol* 1970; 90: S 924-932.
- 80) Marmur JD, MD; Singanalore V. Thiruvikraman, PhD; Billie S. Fyfe, MD; Arabinda Guha, PhD; Samin K. Sharma, MD; John A. Ambrose, MD; John T. Fallon, MD, PhD; Yale Nemerson, MD; Mark B. Taubman, MD. Identification of Active Tissue Factor in Human Coronary Atheroma. *Circulation* 1996; 94: S 1226-1232.
- 81) Meckel CR, Anderson TJ, Mudge GH, Mitchell RN, Yeung AC, Selwyn AP, Ganz P, Simon DI. Hemostatic/fibrinolytic predictors of allograft coronary artery disease after cardiac transplantation. *Vasc Med* 1997; 2(4): S 306-12.
- 82) Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000;173: S 89-97.
- 83) Mesri M and Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocytemicroparticles. *J Immunol* 1998; 161: S 4382–4387.
- 84) Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 1998; 24: S 954–8.
- 85) Mulder AB, Smit JW, Bom VJ, Blom NR, Halie MR, van der Meer J. Association of endothelial tissue factor and thrombomodulin with caveolae. *Blood* 1996; 88(9): S 3667-70.
- 86) Muller YA, Ultsch MH, De Vos A. The crystal structure of the extracellular domain of human tissue factor refined to 1,7 Å resolution. *J Biol Mol.* 1996; 256: S144-159.
- 87) Napoleone E, Di Santo A, Lorenzet R. Monocytes upregulate endothelial cell expression of tissue factor: a role for cell-cell contact and cross-talk. *Blood* 1997; 89: S 541–549.
- 88) Nemerson Y. Tissue factor and haemostasis. *Blood* 1988, 71: S 71-78.

- 89) Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol* 2006; 80 (4): S 714-8.
- 90) Nowak G. Pharmacology of recombinant hirudin. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28 (5): S 415-24.
- 91) OASIS (Organization to Assess Strategies for Ischemic Syndromes). *Circulation* 1997; 96: S 769.
- 92) Ollivier V, J. Chabbat, J. M. Herbert, J. Hakim, D. de Prost. Vascular Endothelial Growth Factor Production by Fibroblasts in Response to Factor VIIa Binding to Tissue Factor Involves Thrombin and Factor Xa. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20: S 1374.
- 93) Osterholm C, Veress B, Simanaitis M, Hedner U, Ekberg H. Differential expression of tissue factor (TF) in calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and rejection-implications for development of a possible diagnostic marker. *Transpl Immunol* 2005;15(2): S 165-72.
- 94) Ott I, Fischer EG, Miyagi Y, Mueller BM, Ruf W. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol* 1998; 140 (5): S 1241-53.
- 95) Ott I, Cornelia Michaelis, Maren Schuermann, Birgit Steppich, Isabell Seitz, Mieke Dewerchin, Dietlind Zohnhofer, Rainer Wessely, Martina Rudelius, Albert Schömig, Peter Carmeliet. Vascular Remodeling in Mice Lacking the Cytoplasmic Domain of Tissue Factor. *Circulation Research* 2005; 97: S 293- .
- 96) Ott I, MD; Berthold Weigand, MS; Ruth Michl, MS; Isabell Seitz, MS; Nooshin Sabbari-Erfani, MS; Franz-Josef Neumann, MD; Albert Schömig, MD. Tissue Factor Cytoplasmic Domain Stimulates Migration by Activation of the GTPase Rac1 and the Mitogen-Activated Protein Kinase p38. *Circulation* 2005; 111: S 349-355.
- 97) Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological role. *Blood Coag Fibrinol* 1998; 9: S 9–14.

- 98) Ragosta M, Barry WL, Gimple LW. Effect of thrombin inhibition with desulfatohirudin on early kinetics of cellular proliferation after balloon angioplasty in atherosclerotic rabbits. *Circulation* 1996; 93: S 1194–1200.
- 99) Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circulation Research* 2006; 99: S 801–815.
- 100) Danny Ramzy, Vivek Rao, Julie Brahm, Santiago Miriuka, Diego Delgado, Heather J. Ross. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Canadian Journal of Surgery* Vol. 48, No. 4, August 2005.
- 101) Rao LV. Tissue factor as a tumor procoagulant. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11(3-4): S 249-66.
- 102) Rao LVM, Pendurthi UR. Tissue factor - factor VIIa signalling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: S 47-56.
- 103) Rapaport SI, Rao LVM. The tissue factor pathway: How it has become a “prima ballerina”. *Thromb Haemost* 1995, 74: S 7-17.
- 104) Refludan®, Fachinformation Hoechst Marion Roussel. 1997.
- 105) Rickles FR, Shoji M, Abe K. The role of the hemostatic system in tumor growth, metastasis, and angiogenesis: tissue factor is a bifunctional molecule capable of inducing both fibrin deposition and angiogenesis in cancer. *J Hematol* 2001; 73(2): S 145-50.
- 106) Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245 (2): S 154–60.
- 107) Ruf W, Mueller BM. Tissue factor in cancer angiogenesis and metastasis. *Curr Opin Hematol* 1996; 3(5): S 379-84.

- 108) Sarembock IJ, Gertz SD, Gimple LW. Effectiveness of recombinant desulphatoirudin (CGP 39393) in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation* 1991; 84: S 232–243.
- 109) Schafer AI, Loscalzo J. Coagulation cascade: an overview. *Thrombosis and Hemorrhage*, Blackwell Scientific Publications, Boston 1994; S 3–12.
- 110) Schmaus D, Weis M. Cardiac allograft vasculopathy: Recent developments. *Circulation* 2008 Apr 22; 117 (16): S 2131-41.
- 111) Semeraro N, Colucci M. Tissue factor in health and disease. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): S 759-64.
- 112) Shet S, Omer Aras, Kalpna Gupta, Mathew J. Hass, Douglas J. Rausch, Nabil Saba, Louann Koopmeiners, Nigel S. Key, and Robert P. Hebbel. Sick blood contains tissue factor–positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood* 2003; 102 (7): S 2678-2683.
- 113) Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC. Tissue Factor in Cardiovascular Diseases Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Circulation* 2006; 113: S 722-731.
- 114) Steinemann S, Ulevitsch RJ and Mackman N. Role of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein/CD14 pathway in LPS induction of tissue factor expression in monocytic cells. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1994; 14: S 1202-1209.
- 115) Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: S 577–582.
- 116) Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, Trulock EP, Waltz DA, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-third official adult heart transplantation report: 2006. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: S 869–879.
- 117) Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM, Broze GJ Jr. Effect of tissue factor deficiency on mouse and tumor development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Jun 24; 94(13): S 6922-6.

118) Wang SS. Treatment and prophylaxis of Cardiac allograft vasculopathy. *Transplant Proc.* 2008 Oct.; S 2609-10.

119) Website der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA), www.emea.europa.eu; Refludan®, Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels (Recherchedatum September 2010).

120) Wehner Jennifer, Morrell Craig N., Reynolds Taylor, Rodriguez E. Rene, Baldwin William M. III Antibody and Complement in Transplant Vasculopathy. *Circulation Research* 2007; 100: S 191.

121) Weitz JI, Crowther M. Direct thrombin inhibitors. *Thromb Res* 2002;106 (3): S 275-84.

122) Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Krobot K, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B. Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation* 2003; 107: S 93–97.

123) Yen Michael H., MD; Pilkington Guy, MS; Starling Randall C., MD, MPH; Ratliff Norman B., MD; McCarthy Patrick M., MD; Young James B., MD; Chisolm Guy M., PhD; Penn Marc S., MD, PhD. Increased Tissue Factor Expression Predicts Development of Cardiac Allograft Vasculopathy. *Circulation* 2002; S 106:1379- .

124) Zucker S, Conner C, DiMassmo BI, Ende H, Drews M, Seiki M, Bahou WF. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1995; 270(40): S 23730-8.

125) Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998; 75(5): S 780-6.

9	Abbildungsverzeichnis	Seite
Abbildung 1:	Angiographischer Befund im Rahmen einer TVP	2
Abbildung 2:	Stadien der TVP	3
Abbildung 3:	Extrazelluläre Domäne von Tissue Factor	6
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Gerinnungskaskade	8
Abbildung 5:	Angriffspunkt von Hirudin in der Gerinnungskaskade	14
Abbildung 6:	Dichtegradientenzentrifugation	23
Abbildung 7:	Unstimulierte TF-Expression	28
Abbildung 8:	LPS-stimulierte TF-Expression	28
Abbildung 9:	Lepirudin, unstimulierte TF-Expression	29
Abbildung 10:	Lepirudin + stimulierte TF-Expression	29
Abbildung 11:	Standardverdünnungskurve eines "rabbit brain" Thromboplastinstandards	31
Abbildung 12:	Schematisches Prinzip des "double-antibody- sandwich"-ELISA	34
Abbildung 13:	Prinzip interkalierender Farbstoffe	39
Abbildung 14a und 14 b:	Induktion der TF-Aktivität in humanen Monozyten durch LPS	43
Abbildung 15:	TF-Aktivität unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten	45
Abbildung 16:	Mittelwerte der TF-Aktivität unstimulierter und LPS- stimulierter Monozyten aus vier unabhängigen Versuchsreihen	45
Abbildung 17:	Reduktion der basalen, unstimulierten TF-Aktivität durch Lepirudin als Funktion der Lepirudin- Konzentration	46
Abbildung 18:	Einfluss der Inkubationszeit von Lepirudin auf die basale TF Aktivität humaner kultivierter Monozyten	47
Abbildung 19:	Effekte verschiedener Lepirudin-Konzentrationen auf die LPS-induzierte TF-Aktivität in vitro kultivierter Monozyten	48

Abbildung 20:	Suppression der LPS-induzierten TF-Aktivität durch Inkubation mit 1µg/ml Lepirudin über 24 Stunden	49
Abbildung 21 A-C:	Einfluss des Inkubationszeitpunktes von Lepirudin unterschiedlicher Konzentration auf die LPS-stimulierte TF-Aktivität humaner Monozyten	51
Abbildung 22:	Mittelwerte der TF-Proteinexpression unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten aus vier unabhängigen Versuchsreihen	54
Abbildung 23:	Reduktion der basalen, unstimulierten TF-Proteinexpression durch Lepirudin unterschiedlicher Konzentration	55
Abbildung 24:	Einfluss der Inkubationszeit von Lepirudin auf die basale TF-Proteinexpression humaner kultivierter Monozyten	56
Abbildung 25:	Effekte verschiedener Lepirudin-Konzentrationen auf die LPS-induzierte TF-Proteinexpression kultivierter Monozyten	57
Abbildung 26:	Einfluss des Inkubationszeitpunktes von Lepirudin auf die LPS-stimulierte TF-Proteinexpression humaner Monozyten	58
Abbildung 27:	Relative TF-mRNA Expression unstimulierter und LPS-stimulierter Monozyten	60
Abbildung 28:	Reduktion der basalen, unstimulierten relativen TF-mRNA Expression durch Lepirudin unterschiedlicher Konzentration	61
Abbildung 29:	Einfluss der Inkubationszeit von Lepirudin auf die basale relative TF-mRNA Expression humaner kultivierter Monozyten	62
Abbildung 30 a-b:	Einfluss von Lepirudin-Konzentration und - Inkubationszeit auf die LPS-stimulierte relative TF-mRNA Expression humaner Monozyten	63

10	Tabellenverzeichnis	Seite
Tabelle 1:	Unterschiede Transplantatvaskulopathie und Koronare Herzerkrankung	3
Tabelle 2:	Sequenzen der verwendeten Primer	38
Tabelle 3:	Funktionelle Charakterisierung der prokoagulatorischen Aktivität als TF-Aktivität in Faktor VII defizientem Plasma	53
Tabelle 4:	Einfluss von PPACK auf prokoagulatorische Aktivität, TF-Proteinexpression und relative TF-mRNA Expression	65

Ehrenerklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Danksagung

Bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Hans Hölschermann danke ich zum einen für die Überlassung des Themas sowie die Bereitstellung der Labore und finanziellen Mittel, die die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben, sowie für seine Betreuung als Doktorvater im Laufe der letzten Jahre und das Korrekturlesen dieser Doktorarbeit.

Mein Dank gilt ferner den Kollegen der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Hans Hölschermann für konstruktive Diskussionen und hilfreiche Anregungen, die zur Ausführung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Besonders herzlich danke ich Frau Behnoush Parviz und Frau Antje Weber für ihre Hilfsbereitschaft bei der Umsetzung der labortechnischen Aufgaben und für die Freundschaft, die sich im Laufe meiner Doktorarbeit und darüber hinaus entwickelt hat.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Dr. med. Thomas Stadlbauer für seine fachliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie, insbesondere meiner Schwester Heidemarie Binder, für die Ermöglichung meines Werdegangs, die fortwährende Motivation und nie endende liebevolle Unterstützung während Studium und Doktorarbeit.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de


ISBN: 978-3-8359-5808-1



9 783835 195808 1